

Centre de recherche Fernand-Séguin de l'hôpital Louis-H.
Lafontaine
Université de Montréal

**Étude du rôle de la tyrosine kinase Src dans la régulation
de la signalisation des récepteurs opioïdes delta (Δ OR)**

Par
Mélanie P.Gobeil

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc)
en pharmacologie

Juillet 2008

© Mélanie P.Gobeil, 2008
Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude de la tyrosine kinase Src dans la régulation de la
signalisation des récepteurs opioïdes delta (Δ OR)

Présenté par :
Mélanie P.Gobeil

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pr Audrey Claing, membre du jury
Pr Denis DeBlois, Président-rapporteur
Pr. Graciela Piñeyro, directrice de recherche

RÉSUMÉ

Les opioïdes sont les analgésiques les plus efficaces mais leur utilisation est limitée par la tolérance, un processus lié en partie à la désensibilisation des récepteurs. Le rôle de la présente étude était de mieux caractériser le processus de désensibilisation des récepteurs et plus particulièrement, d'étudier le rôle de la tyrosine kinase Src sur la régulation de la signalisation des récepteurs delta opioïdes. Nos résultats démontrent que l'inhibition pharmacologique avec PP2 (à faible concentration : 20-40 μ M) ou encore l'inhibition moléculaire de la kinase avec de faibles concentrations d'ADN d'un mutant dominant inactif de Src (0,2 μ g/ml) potentialise l'amplitude et la durée de l'activation de la cascade ERK lorsqu'un agoniste, DPDPE (1 μ M; 5 min), se lie aux récepteurs. Nous avons également démontré que de fortes concentrations d'inhibiteurs de Src (80 et 100 μ M de PP2 ou 1 μ g/ml d'ADN du mutant dominant négatif) bloquent la cascade des MAPK suivant la stimulation de DOR par l'agoniste DPDPE. Ces observations indiquent que Src a un effet biphasique sur l'activité de ERK : l'inhibition complète de Src inhibe l'activité de la cascade MAPK alors qu'une inhibition modérée potentialise cette même cascade. Nous pensons aussi que de fortes concentrations des bloqueurs de Src interfèrent avec l'activation de ERK alors que de faibles concentrations interfèrent avec la désensibilisation des récepteurs. Cette possibilité a été testée à l'aide d'essais d'accumulation d'AMPc qui visaient à évaluer l'effet des bloqueurs de Src (PP2, 20 μ M; 1h) sur la désensibilisation induite par un agoniste. L'activation de DOR par DPDPE inhibe la production d'AMPc, préalablement stimulée par du forskolin, de façon dose-dépendante. Le maximum d'inhibition observé est de 61%, mais lors d'un prétraitement au DPDPE (1 μ M, 30 min) l'inhibition maximale est réduite à 72% de l'inhibition initiale observée. Cependant, un prétraitement des cellules au PP2 (20 μ M pendant 1 heure) avant d'effectuer la désensibilisation protège contre cette désensibilisation. L'effet protecteur des bloqueurs de Src n'entraîne pas de changement au niveau de l'internalisation des DOR mais l'altération de leur internalisation via un mutant tronqué du DOR ou via un milieu sucré hypertonique (0.4M de saccharose) réduit cette protection. Ces données suggèrent alors que l'internalisation optimale du récepteur est nécessaire pour que l'effet protecteur prenne place. Nous concluons donc que Src contribue à la désensibilisation de DOR après que l'internalisation du DOR soit survenue.

MOTS CLÉS

Désensibilisation, récepteur mutant delta opioïde tronqué (DOR344T), Src, 4-amino-5-(4-chlorophényl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2), D-Per-2,5-enkephaline (DPDPE), internalisation, tolérance, kinase activant les protéines mitogéniques (MAPK), kinase régulatrice de signaux extracellulaires (ERK), adénosine monophosphate (AMPc)

ABSTRACT

Opioids are the most effective analgesics available but their use is limited by tolerance. Tolerance is related, at least in part, to receptor desensitization. Hence, the role of the present study was to better characterize the desensitization process, in particular concerning the role of the tyrosine kinase Src on regulation of delta opioid receptor signalling. Our results show that pharmacological inhibition with PP2 (administered at low concentration: 20-40 μ M) or molecular inhibition of the kinase with low expression levels of a dominant negative mutant of Src (0,2 μ g of DNA) potentiate the magnitude and duration of agonist-dependent (DPDPE; 1 μ M; 5 min) activation of the ERK pathway. We also showed that higher concentrations of Src inhibitors (80 and 100 μ M of PP2 or 1 μ g/ml of dominant negative mutant DNA) block the MAPK cascade following DOR stimulation by DPDPE. These observations indicate that Src has a biphasic effect on ERK activity, respectively potentiating or inhibiting agonist stimulation of the MAPK cascade at low and high levels of Src inhibition. We reasoned that high levels of Src blockers were interfering with ERK activation mechanism while low levels of inhibition were interfering with receptor desensitization. This possibility was tested by using cAMP accumulation assays to evaluate the effect of Src blockers (PP2, 20 μ M; 1h) on agonist-induced desensitization. DOR stimulation by DPDPE inhibited forskolin stimulated cAMP production in a dose dependent manner with a maximal reduction of 61%. This inhibitory response was reduced by 72% following pre-exposure to DPDPE (1 μ M, 30 min), an effect that was blocked by pre-treating cells with PP2 (PP2, 20 μ M; 1 h) before desensitization. The protective effect of Src blockers did not involve changes in DOR internalization but interfering with internalization by using an internalization-deficient DOR mutant or hypertonic medium (0.4M sucrose) reduced this protection, indicating the need for optimal internalization in order for the protective effect of Src blockers to take place. Based on the latter observation it was possible to conclude that Src contribution to DOR desensitization is post-endocytic.

KEYWORDS

Desensitization, truncated mutant delta opioid receptor (DOR344T), Src, 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4,d]pyrimidine (PP2), D-Per-2,5-Enkephalin (DPDPE), internalization, tolerance, mitogen-activated protein kinase (MAPK), Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase (ERK), cyclic adenosine monophosphate (cAMP)

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC – adénylate cyclase
 ADNc – Acide désoxyribonucléique complémentaire
 ADP – adénosine diphosphate
 AMPc – adénosine monophosphate cyclique
 ANOVA – analyse de variances
 AP-1 – protéine activatrice 1
 ARF – facteur d'ADP ribosylation
 ATP – Adénosine triphosphate
 ATV (VTA) – aire tegmentale ventrale
 β 2-adr – β -2-adrénergique
 β -arr – β -arrestine
 BSA – albumine de sérum bovin
 CREB – *AMPc response element-binding*
 CSK – Kinase C-terminale de Src
 CTL – contrôle
 DA – dopamine
 DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
 DMSO – dimethyl sulfoxide
 DNM – mutant dominant négatif
 DO – densité optique
 DOR – récepteur delta opioïde
 DOR344T – récepteur delta opioïde tronqué
 DPDPE – D-Per-2,5-enkephaline
 DTT – dithiothréitol
 EC₅₀ – concentration efficace maximale à 50%
 EGFR – récepteur des facteurs de croissances épidermiques
 EL – boucle extracellulaire
 ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
 Emax – efficacité maximale
 ENK – enképhaline
 ERK – kinase régulatrice de signaux extracellulaires

FBS – sérum de bovin fœtal
FLAG – épitope FLAG
FRET – *Fluorescence resonance energy transfer*
G-418 – Hygromycine B ou Géniticine
GABA – acide gaba-aminobutyrique
GAP – protéine activant GTPase
GASP – *G protein coupled receptor Associated Sorting Protein*
GDP – guanosine diphosphate
GEF – facteur d'échange de GTP
GFP – protéine fluorescente verte
GRK – Kinase des récepteurs couplés aux protéines G
GTP – guanosine triphosphate
HEK2 293 – cellule embryonnaire humaine de rein
5-HT – sérotonine
IL – boucle intracellulaire
JNK – Kinase C-Jun N-terminale
KDa – Kilo Dalton
KOR – récepteur kappa opioïde
IBMX – isobutylméthylxanthine
LC – locus ceruleus
MAP – protéine mitogénique activée
MAPK – kinase activant les protéines mitogéniques
MCID – *microcomputer imaging devices*
MOR – récepteur mu opioïde
NA – noradrénaline
NAcc ou NAc – Noyau accumbens
NK-1R – récepteur neurokinine 1
NMDA - N-méthyl D-aspartate
NRM – noyau raphé magnus
NRPG – noyau réticulé paragigantocellulaire
NT – neurotransmetteur
PAG – matière grise périaqueducale
PBS – tampon de phosphate salin

PDGFR – récepteur des facteurs de croissance dérivés des plaquettes
PI3K – phosphatidylinositol-3-kinase
PKA – protéine kinase A
PKC – protéine kinase C
PLC – phospholipase C
PP2 – 4-amino-5-(4-chlorophényl-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
PTK – tyrosine kinase protéique
PTX – toxine pertussique
RCPG – récepteurs couplés aux protéines G
RGS – protéine régulatrice de la signalisation des protéines G
RTK – récepteur à tyrosine kinase
RVM – bulbe rostroventral
SDS – sodium dodecyl sulfate
SFDOR – récepteur delta opioïde marqué au signal FLAG
SFK – kinase de la famille de Src
SH (1, 2 ou 3) – *Src homology domain 1, 2 ou 3*
WORT – wortmannine
WT – type sauvage
Y – tyrosine

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION.....	1
1.1. Récepteurs opioïdes et impact biologique.....	1
1.1.1. Caractéristiques structurales et sous-types de récepteurs.....	2
1.1.2. Distribution et rôle physiologique : douleur et récompense.....	5
1.1.3. Récepteurs opioïdes et cibles pharmacologiques pour les analgésiques.....	9
1.2. Signalisation des DOR	10
1.3. Protéines G	11
1.3.1. Familles et structure	11
1.3.2. Cycle d'activation des protéines G.....	12
1.3.3. Effecteurs activés par les protéines Gi/o	13
1.4. Voies de signalisation intracellulaire liées aux récepteurs opioïdes.....	13
1.4.1. Inhibition de l'adénylate cyclase.....	13
1.4.2. Cascade impliquant les MAPK	15
1.4.2.1 Modules d'activations	15
1.4.2.2 Mécanisme d'activation des MAPK par les RCPG.....	17
1.4.2.3 MAPK et activation des récepteurs opioïdes.....	18
1.5. Tyrosines Kinases.....	19
1.5.1. Familles et fonctions des tyrosines kinases	20
1.5.2. Structure des familles de protéines tyrosines kinases	20
1.5.3. SFK, leur expression, en particulier c-Src	21
1.5.4. Src – domaines majeurs, formes actives et inactives.....	22
1.6. Régulation de l'efficacité de signalisation et rôle de Src dans la régulation des DOR.....	24
1.6.1. Désensibilisation des RCPG	24
1.6.2. Activité de Src et phosphorylation des résidus TYR des RCPG.....	26
1.6.3. Src régule différentes étapes du processus d'internalisation	27
1.7. Projet de recherche	29
2. MATÉRIEL & MÉTHODOLOGIE	31
2.1 Réactifs	31
2.2 Constructions d'ADN.....	31
2.3 Culture cellulaire et transfections.....	32
2.4 Accumulation d'AMPc	33

2.5 Immunobuvardage et SDS-PAGE.....	34
2.6 ELISA	37
2.7 Analyse statistique	38
3. RÉSULTATS	39
3.1. Étude de l'activation de ERK par les DOR	39
3.1.1. La phosphorylation de ERK suivant la stimulation de DOR est dépendante des protéines Gi/o	39
3.1.2. La phosphorylation de ERK suivant la liaison d'un agoniste est indépendante de la transactivation des RTK	41
3.1.3. L'activation de ERK est indépendante du phoshatidylinositol 3-kinase (PI3K)....	44
3.2. Étude de l'activation de Src par les DOR	45
3.2.1. La stimulation des DOR par un agoniste active Src	46
3.2.2. L'activation de Src suivant la liaison d'un agoniste DOR est dépendante des protéines G.....	47
3.3. Étude de l'implication de Src dans l'activation de la voie ERK	48
3.3.1. L'inhibition de Src produit un effet biphasique sur l'activité de la protéine ERK suivant l'activation de DOR par DPDPE	48
3.3.2. L'inhibition pharmacologique de Src prolonge l'activité de la cascade ERK.....	52
3.4. Étude de l'implication de Src dans la désensibilisation des récepteurs DOR	54
3.4.1. L'inhibition de Src protège contre la désensibilisation par DPDPE dans un essai d'accumulation d'AMPC	54
3.4.2. L'inhibition de Src n'a pas d'effet sur le processus d'internalisation des DOR.....	59
3.5. Impact de la suppression de la queue C-terminale du DOR sur sa désensibilisation.....	61
3.5.1. L'internalisation du récepteur tronqué est moins efficace que celle de la forme sauvage, mais l'efficacité de signalisation demeure inchangée.....	62
3.5.2. L'efficacité de l'inhibiteur PP2 à protéger contre la désensibilisation par DPDPE est moindre chez les DOR tronqué que chez les DOR de type sauvage.	63
3.6. Impact du saccharose sur la désensibilisation des récepteurs DOR.....	66
3.6.1. Le saccharose bloque l'internalisation du DOR et réduit sa capacité de signalisation.	66
3.6.2. La capacité de PP2 à protéger contre la désensibilisation est presque abolie en présence de saccharose.....	67
4. DISCUSSION	70

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	78
6. RÉFÉRENCES	80
7. ANNEXES.....	96

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Signalisation et désensibilisation des récepteurs DOR de type sauvage, tronqués et type sauvage exposé à une solution hypertonique.....	66
---	-----------

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique de la séquence du récepteur delta opioïde de rat.....	4
Figure 2. Représentation mécanistiques et anatomiques du système de contrôle descendant endogène de la douleur, montrant les endroits ciblés par les opioïdes exogènes.	7
Figure 3. Simplification de l'action des opioïdes sur l'aire tegmentale ventrale et le noyau accumbens.	9
Figure 4. Représentation de quelques voies induites par les protéines Gi une fois les récepteurs opioïdes activés par un agoniste en situation aiguë.	15
Figure 5. Schématisation de l'organisation structurale des SFK. A. Représentation des formes actives et inactives de Src.	23
Figure 6. Schématisation du mécanisme de désensibilisation homologue des récepteurs mû.	25
Figure 7. ERK1/2 devient phosphorylée suivant la liaison de l'agoniste DPDPE au DOR.	40
Figure 8. L'activation de ERK par les agonistes DOR ne nécessite pas la transactivation de récepteurs à tyrosine kinase (RTK).	43
Figure 9. L'activation de ERK par les agonistes DOR ne nécessite pas la PI3K.....	45
Figure 10. L'activation de DOR par un agoniste augmente la phosphorylation de Src.	46
Figure 11. L'activation de Src est dépendante des protéines Gi/o.....	48
Figure 12. L'inhibiteur pharmacologique de Src, PP2, produit un effet biphasique sur l'activation de ERK par DOR.	51
Figure 13. Le mutant inactif de Src (K296R/Y528F) produit un effet biphasique sur l'activation de ERK par DOR.	52
Figure 14. Cinétique d'activation de la cascade ERK suivant la liaison de l'agoniste DPDPE au δOR.	53

Figure 15. Cinétique d'activation de la cascade ERK en présence et absence de PP2 suivant la liaison de l'agoniste DPDPE au δ OR.	54
Figure 16. Effet de PP2 sur l'inhibition de la production d'AMPc lors de la désensibilisation du δ OR par DPDPE.....	56
Figure 17. Effet d'un mutant inactif dominant de Src sur l'inhibition de la production d'AMPc lors de la désensibilisation du δ OR par DPDPE.....	58
Figure 18. Comparaison de la cinétique d'internalisation des DOR en présence et en absence de PP2.	59
Figure 19. Comparaison de la cinétique d'internalisation de cellules exprimant transitoirement ou non un mutant inactif de Src.....	61
Figure 20. Comparaison de la cinétique d'internalisation de cellules exprimant la forme tronquée ou la forme complète du récepteur DOR.	62
Figure 21. Comparaison de l'effet du DPDPE sur le % d'inhibition de production d'AMPc chez le DOR sauvage et le DOR tronqué.	63
Figure 22. Effet du PP2 sur la cinétique d'inhibition de la production d'AMPc lors de la désensibilisation du δ OR tronqué par DPDPE.....	65
Figure 23. Comparaison de la cinétique d'internalisation du récepteur DOR en présence et en absence de saccharose.....	67
Figure 24. Effet du saccharose sur la désensibilisation du δ OR de type sauvage.....	69
Figure 25. Schématisation de l' <i>interaction</i> entre la protéine Src et le DOR suivant la liaison d'un agoniste.	79

*IL NE FAUT JAMAIS LÂCHER PRISE,
TEL MON INVINCIBLE PÈRE
ENCORE LÀ POUR NOUS,
TOUJOURS LÀ POUR MOI!*

REMERCIEMENTS

Je tiens en tout premier lieu à remercier les Pr Audrey Claing et Denis DeBlois pour avoir accepté de critiquer ce travail non exhaustif. Je remercie également l'ensemble des membres passés et présents du centre de recherche Fernand-Séguin, des gens fort sympathiques avec qui j'ai eu la chance d'échanger mais également de rigoler ! Certains ont eu une participation plus étroite dans ce projet de par leurs conseils, critiques, instructions et expériences. Nicolas Audet, Geneviève Lamothe, Karine Huard, Élodie Lahlou et Pascal Beauchamp. À vous tous, je vous remercie, tant pour votre support moral qu'intellectuel ou pratique. À cet effet, je tiens à mentionner que les figures 13 et 18 à 20 ont été exécutées par Nicolas Audet, étudiant au doctorat en pharmacologie alors que les figures 21 à 24 ont été exécutées par Élodie Lahlou, candidate au post-doctorat.

Je dois avouer que la découverte du centre Fernand-Séguin en 2003 fut très hasardeuse. À cette époque, je cherchais un stage de laboratoire pour l'obtention de mon baccalauréat en biologie. J'étais alors loin de me douter que j'allais entreprendre une grande aventure. Le Pr. Piñeyro a su croire en moi et ce, sans savoir dans quelle péripétie elle s'embarquerait ! Néanmoins, elle a su m'informer, m'enseigner, me supporter, m'épauler, me réconforter et surtout me corriger. Elle a fait preuve d'une grande compréhension et d'une souplesse inégalable et ce, même après mon départ en médecine, il y a de cela déjà 3 ans.

Je me dois également de remercier mes parents, Marcel et Linda, mon frère Martin et mes sœurs, Julie et Isabelle ainsi que mon copain David qui, à défaut de comprendre mes péripéties, m'ont supportée moralement et surtout, ont supporté mes nombreuses discussions qui leur paraissaient impénétrables !

Enfin, je me dois de remercier les Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ) qui m'ont supporté financièrement par l'octroi d'une bourse d'étude de 2^e cycle.

1. INTRODUCTION

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) forment une grande famille de molécules de surface cellulaire impliquées dans la transmission de signaux ^{1,2}. Ces récepteurs sont constitués de 7 domaines transmembranaires qui font saillies à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule et qui sont liés entre eux par des boucles intra- et extracellulaires. Les RCPG prennent part à divers processus physiologiques ³, ce qui les rend très important pharmacologiquement. En fait, les RCPG sont la cible de plus de 70% d'agents thérapeutiques présentement sur le marché ⁴ et environ 80% des hormones et neurotransmetteurs connus interagissent avec eux ^{3,5}.

1.1. Récepteurs opioïdes^{*} et impact biologique

Les récepteurs opioïdes appartiennent à la grande famille des RCPG. Ils constituent la cible principale des substances opioïdes telles la morphine et certains peptides endogènes comme la β -endorphine, la met- et la leu-encéphalines ainsi que la dynorphine. Ces substances agissent en modifiant l'activité d'un système endogène qui comprend trois types de récepteurs connus sous les vocables μ (mû), δ (delta) et κ (kappa) ⁶. Un tel système permet le contrôle de plusieurs fonctions physiologiques importantes notamment la nociception, le système nerveux autonome, la perception sensorielle, les émotions, la cognition, ainsi que la réponse immunitaire ⁷. Parmi les fonctions autonomes régulées par le système endogène, on retrouve la respiration ⁸, la thermorégulation ⁹ et la motilité gastro-intestinale ¹⁰. On remarque ainsi une altération de ces fonctions lors d'un usage abusif ou à fortes doses d'opioïdes ^{11,12}. En

^{*} On constate généralement une utilisation assez indifférenciée des termes *opioïde* et *opiacé* dans la documentation spécialisée. À l'origine, *opioïde* était le terme réservé à la désignation des composés synthétiques à effet semblable à celui de la morphine. On l'utilise maintenant pour désigner les alcaloïdes de l'opium, les peptides opioïdes endogènes ainsi que les composés semi-synthétiques et synthétiques dont l'effet est semblable à celui de la morphine. Certains auteurs utilisent le terme *opiacé* en ce sens, bien que ce dernier, au sens strict, signifie « substance qui contient de l'opium ou une préparation d'opium ».

plus de véhiculer les effets des opioïdes endogènes, ces récepteurs sont la cible de nombreux ligands exogènes ayant diverses propriétés thérapeutiques. Notamment, ils agissent sur les émotions via des récepteurs localisés dans le circuit limbique¹³ mais surtout, ils ont la capacité de contrôler la nociception et certains sont efficaces pour contrer la diarrhée et la toux¹⁴.

1.1.1. Caractéristiques structurales et sous-types de récepteurs

Les récepteurs opioïdes appartiennent à la classe A (Rhodopsine) de la famille des RCPG. Les membres de cette classe possèdent un domaine N-terminal extracellulaire, sept domaines hélicoïdaux transmembranaires liés les uns aux autres par des domaines intra- et extracellulaires (ou boucles), ainsi qu'une queue C-terminale intracellulaire. Entre eux, les récepteurs opioïdes sont relativement homologues puisqu'ils présentent une séquence d'acides aminés identiques à 60%. La plus grande homologie se retrouve à l'intérieur des domaines transmembranaires (73-76% de similitude) et des régions intracellulaires qui sont le site de liaison des protéines G et des effecteurs (63-66% de similitude) alors que les régions extracellulaires – qui constituent le site d'interaction des ligands pour moduler la liaison, la sélectivité et l'activation¹⁵ – divergent considérablement (34-40% de similitude)^{16,17}. Une différence notable a été notée par Whistler *et al*¹⁸ au niveau de la queue C-terminale des récepteurs mu et delta. Ce groupe a identifié une protéine qui se lie préférentiellement à la queue cytoplasmique des DOR ; il s'agit d'une GASP (pour «GPCR-associated sorting protein») qui entraîne une dégradation rapide des DOR alors que les MOR ne subissent pas cette dégradation, il sont plutôt recyclés à la surface cellulaire¹⁸. En revanche, les MOR possèdent une séquence signal de 17 acides aminés qui dirige leur recyclage à la membrane cytoplasmique¹⁹; une séquence

absente des autres récepteurs opioïdes. À l'intérieur de cette séquence, les résidus LENLEAE semblent essentiels pour un recyclage efficace ¹⁹.

Au niveau de la composition des récepteurs opioïdes, on retrouve des sites de glycosylation des asparagines dans le domaine N-terminal, ces derniers pourraient avoir un rôle dans les voies de maturation des récepteurs ²⁰. Plusieurs résidus cystéines se retrouvent dans la séquence des récepteurs et possèdent des rôles clés : on en retrouve dans les première et deuxième boucles extracellulaires pour la formation de ponts disulfures; d'autres, 1 ou 2 selon le sous-type de récepteur, se localisent dans la région proximale du domaine C-terminal pour la palmitoylation ^{20,21}. Ce phénomène prendrait part au transport du récepteur à la surface cellulaire ainsi que dans la transduction de signaux suivant la liaison d'un agoniste en retardant la phosphorylation du récepteur par certaines kinases ^{16,21,22}. Au niveau des boucles intracellulaires et de la queue C-terminale, les récepteurs opioïdes ont en commun plusieurs résidus susceptibles d'être phosphorylés par des kinases : dans la première boucle intracellulaire, on retrouve 1 résidu tyrosine et 3 thréonines; dans la seconde, 1 sérine, 1 thréonine et 1 tyrosine; dans la troisième, 3 sérines et 1 tyrosine; et enfin dans le domaine C-terminal, 2 tyrosines et 1 sérine ¹⁶. En fait, la phosphorylation des résidus contenus dans la troisième boucle intracellulaire ainsi que dans le domaine C-terminal est impliquée dans le mécanisme de désensibilisation ¹⁴ (sera vu plus loin en détail). De plus, les tyrosines contenues dans les 1^{ère} et 2^{ème} boucles régulent l'activité des KOR et MOR ^{23,24}. Aussi, un motif hautement conservé des RCPG se trouve dans les récepteurs opioïdes, le motif «D/ERY». Il est contenu entre le troisième domaine transmembranaire et la seconde boucle intracellulaire et joue un rôle critique dans l'activation du récepteur en le maintenant dans une conformation inactive ^{25,26}.

Enfin, un autre motif, le motif NPXXY, est campé à l'interface membrane – 7^e domaine transmembranaire afin de maintenir la structure du récepteur et comme le motif D/ERY, il pourrait contribuer à l'activation du récepteur ²¹. L'ensemble des propriétés structurales des récepteurs delta opioïdes est représenté à la figure 1.

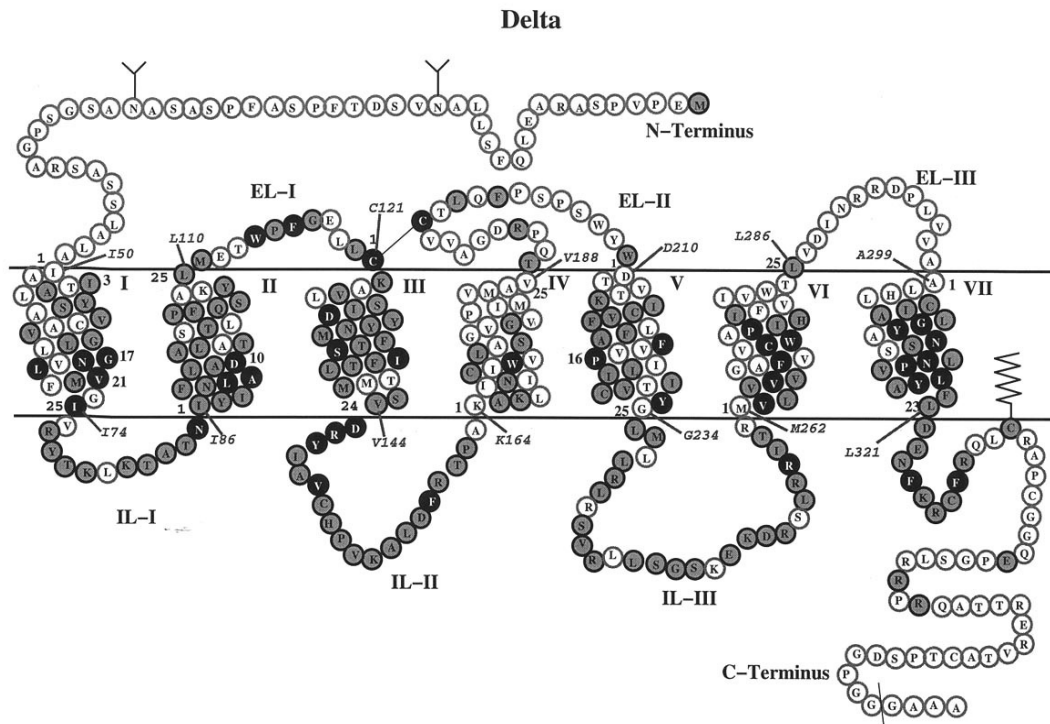


Figure 1. Représentation schématique de la séquence du récepteur delta opioïde de rat. Les acides aminés sont représentés par leur code à une lettre. Les lignes horizontales représentent la membrane cytoplasmique. Les domaines transmembranaires sont numérotés de I à VII et les boucles sont déterminées par les lettres IL et EL selon leur emplacement (IL – intracellular loop ; EL – extracellular loop). Les acides aminés conservés entre les différents sous-types de récepteurs sont représentés dans les cercles noirs et gris. Les sites de N-glycosylation sont étalés dans la queue N-terminale et identifiés par un « Y ». Un des deux sites de palmitoylation est indiqué dans la queue C-terminale. Un pont disulfure est représenté entre les cystéines des boucles EL-I et EL-II. Le motif D/ERY est situé dans la boucle IL-II et le motif NPXXY est retrouvé dans le domaine VII. Les résidus sérines, tyrosines et thréonines sont représentés respectivement par les lettres S, T et Y. Source : <http://www.opioid.umn.edu/intro2.html>

De fortes évidences pharmacologiques indiquent l'existence de différents sous-types de récepteurs. Il existe trois types de récepteurs opioïdes, soit mu, delta et kappa, et ces derniers sont codés par des gènes différents. De ces trois types, le récepteur mu demeure le plus étudié par son important pouvoir analgésique et par son implication dans l'abus de drogues. Des études de liaison ont proposé l'existence d'environ 21 sous-types pharmacologiques de mu qui répondraient différemment aux ligands ²⁷. Les plus étudiés se dénomment $\mu 1$, $\mu 2$ et M6G ²⁸. Ces études pré-cliniques permettent de faire la correspondance avec les différences cliniques notées au sein des réponses variables aux analgésiques des patients. Cependant, puisque un seul gène MOR, *Oprm*, a été identifié ²⁹, la présence de différents sous-types pharmacologiques pourrait être attribuable à l'épissage alternatif ³⁰ ou encore à la formation d'hétérodimères avec d'autres récepteurs ³¹. Pour les DOR, malgré les différents sous-types identifiés pharmacologiquement, il n'y a aucune évidence que ces sous-types résultent de l'épissage alternatif ¹⁷. L'explication la plus vraisemblable pour leur différence pharmacologique serait imputable à l'hétérodimérisation avec d'autres DOR, MOR ou encore KOR ³¹. Finalement, 3 différents sous-types de KOR existeraient, mais il n'est pas clair s'il s'agit de variants dus à l'épissage alternatif ³² ou de l'effet de l'hétérodimérisation avec d'autres classes de récepteurs.

1.1.2. Distribution et rôle physiologique : douleur et récompense

Les récepteurs opioïdes sont distribués dans tout le système nerveux à différents niveaux d'expression selon les régions et les types de récepteur ⁶. Au niveau des structures du système nerveux, le cortex, le thalamus, l'hypothalamus et l'amygdale sont les régions les mieux connues pour moduler l'intégration de l'information dans la perception de la douleur ainsi que de la réponse autonome qui accompagne la perception douloureuse. Ces différentes régions contiendraient

une quantité importante de récepteurs opioïdes ³³. Le tronc cérébral, la matière grise périaqueducale (PAG) et le bulbe rostroventral (RVM) contiennent également des récepteurs opioïdes ³⁴. D'autres récepteurs se situent au niveau spinal, ce qui permet d'inhiber le réflexe spinal nocicepteur et d'inhiber les afférences spinothalamiques. Ces récepteurs se retrouvent dans les lamina I à V de la substantia gelatinosa ¹⁶. Selon Stein et Yassouridis ³⁵, les opioïdes seraient également capables d'inhiber les décharges d'afférences nociceptives en périphérie et plus particulièrement lors de l'inflammation, car les récepteurs opioïdes seraient plus fortement exprimés dans ces conditions. De façon résumée, la modulation de la douleur s'effectue de la façon suivante (voir aussi figure 2) : l'hypothalamus, l'amygdale et le cortex envoient des influx aux neurones du PAG et au noyau réticulé paragigantocellulaire (NRPG), lesquels projettent en retour au RVM incluant le noyau du raphé magnus. De là, des neurones 5-HT se dirigent vers la substantia gelatinosa de la corne dorsale de la moelle épinière pour y exercer une influence inhibitrice sur les afférences nociceptives par l'intermédiaire d'interneurones relâchant l'encéphaline, un opioïde endogène. Le RVM projette également au locus coeruleus (LC), lequel envoie des projections noradrénergiques à la corne dorsale de la moelle épinière. En fait, c'est à ce niveau que se situent les terminaisons nerveuses des fibres A δ et C ³⁶ et par conséquent, c'est à ce niveau que l'inhibition survient par les interneurones opioïdiques. Globalement, il y aurait présence de récepteurs opioïdes sur les afférences primaires neuronales produisant de la substance P (substance responsable de l'hyperalgésie) ainsi que sur les neurones spinothalamiques qui constituent les seconds neurones de la voie afférente de la douleur. L'analgésie survient, entre autre, suite à l'inhibition par les opioïdes du relâchement de la substance P et suite à l'inhibition des neurones spinothalamiques.

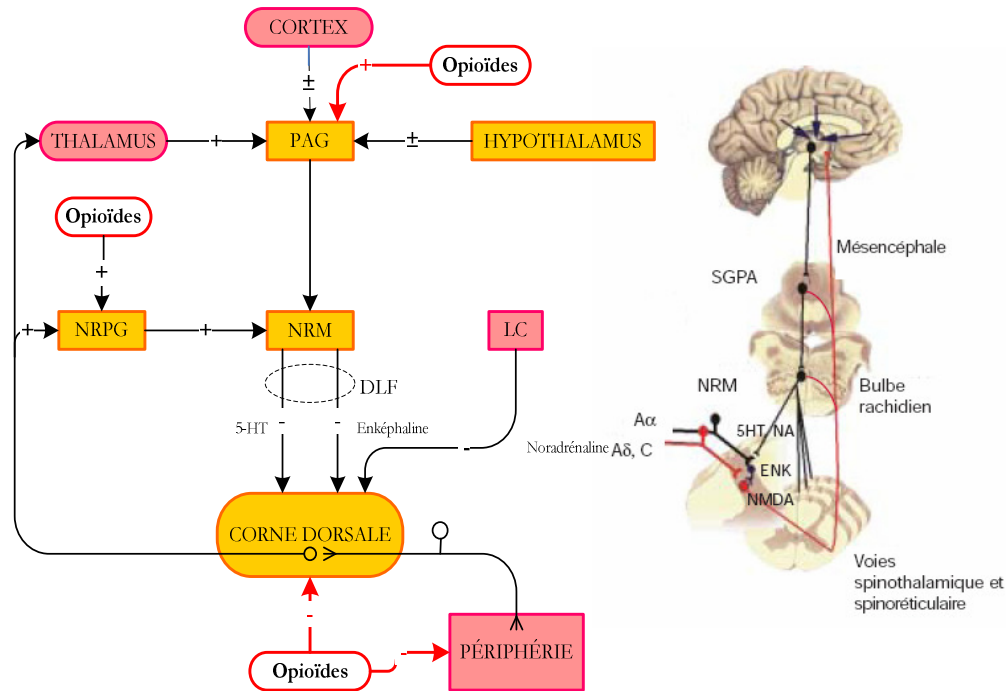


Figure 2. Représentation mécanistique et anatomique du système de contrôle descendant endogène de la douleur, montrant les endroits ciblés par les opioïdes exogènes. Le cortex, le thalamus ou l'hypothalamus, au même titre que les opioïdes exogènes, activent la substance grise périaqueducale. Cette dernière envoie des efférences au noyau du raphé magnus (NRM). Ce dernier projette à la corne dorsale de la moelle épinière pour inhiber les afférences nociceptives. L'inhibition se fait par le biais d'interneurones opioïdiques (non montré sur la figure). Les opioïdes peuvent également agir sur le noyau paraventriculaire (NRPG) pour exercer cet effet inhibiteur sur les afférences nociceptives. Les opioïdes exogènes agissent en outre directement au niveau de la corne dorsale ainsi qu'au niveau périphérique. Le locus coeruleus (LC) projette à la corne dorsale via des neurones noradrénergiques pour y produire un effet antinociceptif. Source : à gauche, adapté de Pharmacology ³⁷; à droite, tiré de la revue *Le clinicien* ³⁸.

En plus d'être situés dans les voies inhibitrices de la douleur, les récepteurs opioïdes se retrouvent dans l'aire tegmentale ventrale (ATV), le noyau accumbens (NAcc), le noyau raphé ³⁹ et dans plusieurs structures du système limbique. Certaines de ces régions prennent part au complexe circuit de récompense et à la réponse motivée. Les centres de contrôle prépondérants du circuit de récompense sont l'aire tegmentale ventrale, le noyau accumbens ainsi que leurs projections au cortex préfrontal et à certains noyaux thalamiques. Ce circuit fonctionne de la façon suivante : le signal de récompense active l'ATV, laquelle projette dans le NAcc, dans

le septum, dans l'amygdale, dans les noyaux thalamiques et dans le cortex préfrontal pour y libérer de la dopamine. La portion centrale (ou «core») du NAcc prend part au contrôle moteur de la récompense, le cortex préfrontal intervient dans l'attention et la sélection des comportements tandis que la portion externe (ou «shell») du NAcc participe à la composante hédonique de la récompense ⁴⁰. Comme la libération de DA dans le circuit de récompense est contrôlée en partie par le système opioïde, ce dernier a le pouvoir de renforcer la réponse de récompense. Selon Nestler ⁴¹, certains interneurons gabaergiques de l'ATV et du NAcc seraient munis de récepteurs opioïdes dont le rôle serait important dans la régulation du circuit. Sous l'action d'agonistes opioïdes, l'inhibition de ces interneurons sur l'ATV est levée, désinhibant les projections dopaminergiques en direction du NAcc ou en direction de d'autres cibles pour produire la réponse de récompense ⁴¹. Cette dernière peut être indépendante du système dopaminergique puisqu'il y a également des récepteurs opioïdes dans le NAcc (voir figure 3).

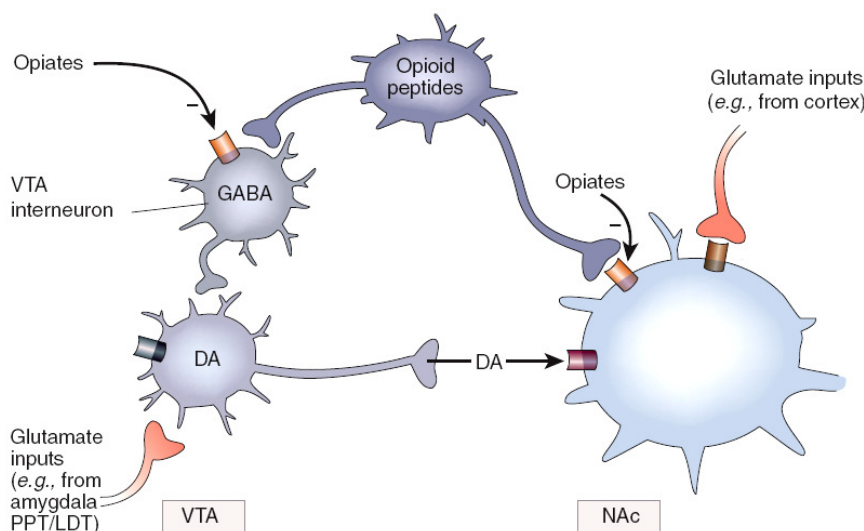


Figure 3. Simplification de l'action des opioïdes sur l'aire tegmentale ventrale et le noyau accumbens. On constate que l'inhibition d'un interneurone GABA du VTA par les opioïdes permet aux afférences glutamatergiques de la même région de stimuler la libération de DA. Cette libération produit la réponse de récompense dans le NAc. Les opioïdes peuvent également stimuler directement la réponse de récompense par la présence de récepteurs dans le NAc. VTA – aire tegmentale ventrale, DA – dopamine, NAc – noyau accumbens et GABA – acide γ -aminobutyrique. Source : Nestler 2005⁴²

1.1.3. Récepteurs opioïdes et cibles pharmacologiques pour les analgésiques.

Les analgésiques exogènes agissent de la même façon que les substances endogènes pour empêcher la douleur : ils modulent l'algésie en inhibant les canaux calciques voltage-dépendants pour empêcher la libération de neurotransmetteurs (i.e. substance P) et/ou ouvrent les canaux potassiques pour hyperpolariser les neurones, un effet garant de l'inhibition de l'excitation neuronale³⁴. Les substances opioïdes capables d'activer les récepteurs delta ont un pouvoir antalgique plus faible que celles qui agissent sur les récepteurs μ . Toutefois, les agonistes delta ne provoquent que peu ou pas d'effets secondaires comparés aux agonistes μ , c'est-à-dire qu'ils induisent moins de dépression respiratoire, de constipation et de dépendance physique^{43,44}. Ainsi, les agonistes DOR deviennent des cibles attrayantes pour le traitement des douleurs sévères. Plusieurs hypothèses sont énoncées quant à leur pouvoir analgésique limité. Par exemple, à l'état d'équilibre, seulement une faible

proportion est présente sur la membrane plasmique des neurones, la majorité étant retenue dans le cytoplasme ⁴⁵. Par contre, dans le cas de douleur chronique ou lors d'administration de morphine prolongée, les DOR peuvent être recrutés à la surface cellulaire, ce qui accentue l'effet pharmacologique des agonistes ^{46,47,48}.

1.2. Signalisation des DOR

Les récepteurs monomères delta, nommés ainsi pour vas deferens car ils ont été découverts dans cette région pour la première fois ⁴⁹, sont couplés négativement à l'adenylate cyclase via la protéine de transduction G α i/o sensible à la toxine pertussique (voir section suivante pour plus de détails). Ils exercent alors un contrôle inhibiteur sur la voie AMPc dépendante lors d'une stimulation aiguë ^{16,50}. En outre, ces récepteurs sont directement couplés à des canaux calciques et potassiques voltage-dépendants par l'intermédiaire des sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G ⁵¹. Ainsi, leur stimulation par un agoniste influence directement l'activité électrique des neurones en réduisant leurs décharges neuronales par hyperpolarisation de leur potentiel de membrane et par la réduction de la libération calcium-dépendante de neurotransmetteurs ^{52,53}. Les DOR activent également la voie ERK, voie autrefois reconnue comme exclusive aux récepteurs à tyrosines kinases (RTK). Les récepteurs delta ont la capacité de former des oligomères avec d'autres DOR ou même avec les autres membres de la famille des récepteurs opioïdes, ce qui modifie en partie leur signalisation. Lorsqu'ils sont jumelés avec un autre DOR, leur profil de signalisation ne se modifie pas. Par contre, l'hétéro-oligomère MOR-DOR se couple à des protéines G insensibles à la toxine pertussique et la liaison de ligands pour chaque type de récepteur entraîne des effets synergiques ³¹. L'hétéro-oligomère DOR-KOR amène un effet synergique sur les cascades AMPc et MAPkinase.

1.3. Protéines G

1.3.1. Familles et structure

Les protéines G constituent un hétérotrimère, lequel est formé des sous-unités alpha, beta et gamma. Plusieurs sous-types de chacune de ces sous-unités ont été clonés et la myriade de combinaisons entre chacun des sous-types de sous-unité leur attribue des effets différents sur la neurotransmission ⁵⁴. Par convention, elles sont classifiées en 4 familles selon le type de protéine alpha : on reconnaît les G_s , les $G_{i/o/t/z}$ auxquelles sont couplées les DOR, les $G_{q/11}$ ainsi que les $G_{12/13}$. Les familles G_s , et $G_{q/11}$ ont des effecteurs très bien définis, soit l'adénylate cyclase (AC) et la phospholipase C- β (PLC- β) respectivement ⁵⁵. La signalisation de la famille d'intérêt, $G_{i/o/t/z}$, est plus complexe car elle se fait à la fois par les sous-unités α et les β/γ (ils agissent en pair) ⁵⁵. Enfin, les fonctions régulées par la famille $G_{12/13}$ sont diverses.

Au niveau de leur structure, les protéines $G\alpha$ contiennent 2 domaines : un domaine GTPase impliqué dans la liaison et l'hydrolyse du GTP et un domaine hélicoïdal qui ensevelit le GTP à l'intérieur du cœur de la protéine ⁵⁶. Ce même domaine hélicoïdal pourrait également avoir le rôle de diriger la spécificité du récepteur envers le bon effecteur couplé aux protéines G. En fait, l'interaction entre le récepteur et la protéine G se fait majoritairement au niveau de la 3^e boucle intracellulaire du récepteur pour la spécificité, alors que la 2^e boucle du récepteur est déterminante dans l'efficacité. Decailot *et al* ⁵⁷ ont démontré que la queue C-terminale du récepteur constitue un site important d'interaction puisque des mutations à ce niveau peuvent compromettre l'interaction récepteur – protéines G. Cependant, certains affirment que la spécificité récepteur – protéine G n'est pas définie par une seule caractéristique structurale de la sous-unité α de la protéine G ou

du récepteur. Cela résulterait plutôt d'un réseau de contacts spécifiques entre le récepteur et les protéines G, un réseau qui diffère pour chacun des types de protéines α et pour chacun des types de récepteurs, ce qui entraîne une multitude de combinaisons possibles responsables de la spécificité ⁵⁶.

1.3.2. Cycle d'activation des protéines G

L'activation du récepteur suivant la liaison d'un ligand facilite l'arrimage des protéines G hétérotrimériques aux domaines intracellulaires de ce récepteur. Les protéines adoptent alors une conformation active qui permet de remplacer un GDP de la poche de liaison, auparavant lié à la protéine $G\alpha$ inactive, par un GTP à cette même sous-unité devenue active. Cette étape est limitante dans le processus d'activation des protéines G. L'hétérotrimère maintenant actif se dissocie pour activer les effecteurs appropriés : d'une part, le dimère $G\beta\gamma$ active ses effecteurs et d'autre part, la $G\alpha$ active ses effecteurs. Bünemann *et al* ⁵⁸⁻⁶⁰ ont démontré, à l'aide d'expériences en FRET («fluorescence resonance energy transfer»), que l'activation des protéines G résultait plutôt d'un changement de conformation des sous-unités que de leur séparation, mais cela fait toujours objet de nombreuses études. L'inactivation des protéines G survient à la suite de l'hydrolyse du GTP en GDP, processus engendré grâce au domaine GTPase de la sous-unité α elle-même. Cependant, ce processus hydrolytique peut être accéléré par les protéines activatrices de GTPase (nommées GAP) comme les régulateurs de la signalisation des protéines G (RGS). Certains effecteurs des sous-unités α , comme la phospholipase- β , l'adénylate cyclase V ou la sous-unité γ de la phosphodiesterase, exercent un rétro-contrôle inhibiteur sur l'amplitude et la durée du signal générés par la sous-unité α active ⁵⁶. En fait, ces différents effecteurs sont des GAP.

1.3.3. Effecteurs activés par les protéines Gi/o

Originellement, cette voie fut identifiée par sa capacité à inhiber l'AC et par le fait même, la formation d'AMPc⁵⁵. La signalisation via G α i est inhibée par la toxine pertussique qui l'ADP-ribosyle, ce qui empêche alors toute interaction avec le récepteur pour la transduction de signaux. Lorsqu'actif, le complexe G $\beta\gamma$ provenant des Gi/o interagit directement avec plusieurs molécules effectrices : il recrute les GRK (kinase des récepteurs à protéines G) à la membrane; régule la PLC- β 1, - β 2 et - β 3^{61, 62} ; active les canaux potassiques⁶³⁻⁶⁵; inhibe les canaux calciques⁶⁶ et enfin, stimule l'AC II et IV^{67,68} le facteur d'échange Ras⁶⁹; la protéine kinase Raf-1⁷⁰ ainsi que le phosphoinositol-3-kinase (PI3K). Il a également été démontré par Ma *et al*⁷¹ que la protéine G α était capable d'interagir directement avec la tyrosine kinase C-Src, mais ces observations n'ont été notées que par ce groupe de chercheurs.

1.4. Voies de signalisation intracellulaire liées aux récepteurs opioïdes

1.4.1. Inhibition de l'adénylate cyclase

L'activation de l'un ou l'autre des types de récepteurs opioïdes entraîne des effets cellulaires communs. Les récepteurs opioïdes actifs inhibent un effecteur important, l'AC, par l'intermédiaire de la sous-unité α des protéines G, diminuant alors la production d'AMPc. Malgré une utilisation expérimentale fréquente par le passé et encore aujourd'hui de ce phénomène pour étudier le couplage entre les récepteurs opioïdes et leurs effecteurs, il reste que la signification physiologique de cette inhibition ne commence qu'à être démystifiée. Par exemple, on sait qu'au niveau du LC, l'absence d'inhibition par les opioïdes amène une augmentation de l'activité de l'AMPc qui promeut, à son tour, l'activation d'une protéine kinase, la protéine kinase A (PKA). Cette cascade de signalisation régule de nombreux processus

cellulaires, comme le relâchement de neurotransmetteurs ⁷², et altère l'expression de certains gènes par la stimulation de différents facteurs de transcription tels que CREB. Également, la baisse d'AMPc à l'intérieur de la cellule module un courant cationique non-sélectif voltage-dépendant ⁷³. Normalement, ce courant est activé en réponse à une hyperpolarisation de la cellule pour rétablir le potentiel membranaire à la normale. Cependant, l'AMPc intracellulaire régule ce courant : une forte concentration d'AMPc l'active pour rendre le potentiel peu négatif et une faible concentration l'inhibe ⁷⁴. Ainsi, en présence d'opioïdes, le potentiel de membrane des neurones du LC s'hyperpolarise en réponse à l'inhibition du canal cationique, réduisant alors l'excitabilité de la cellule ⁷³.

Il a été noté dans certaines régions de l'encéphale que le système opioïde pouvait aussi stimuler la production d'AMPc suivant la liaison d'un agoniste en situation aiguë. Deux régions ont été identifiées, soit le bulbe olfactif ⁷⁵ et des afférences neuronales primaires ⁷⁶. La stimulation d'AMPc par les opioïdes se rapporte normalement en situation chronique, lorsque les phénomènes de désensibilisation des récepteurs sont enclenchés et que les facteurs de transcription altèrent l'expression génétique de même que le phénotype fonctionnel des neurones. Ces changements phénotypiques associés avec l'utilisation à long terme d'opiacés expliquent en partie l'existence du syndrome d'abstinence (ou de manque) et l'humeur dysphorique retrouvée chez les consommateurs dépendants ⁷⁷.

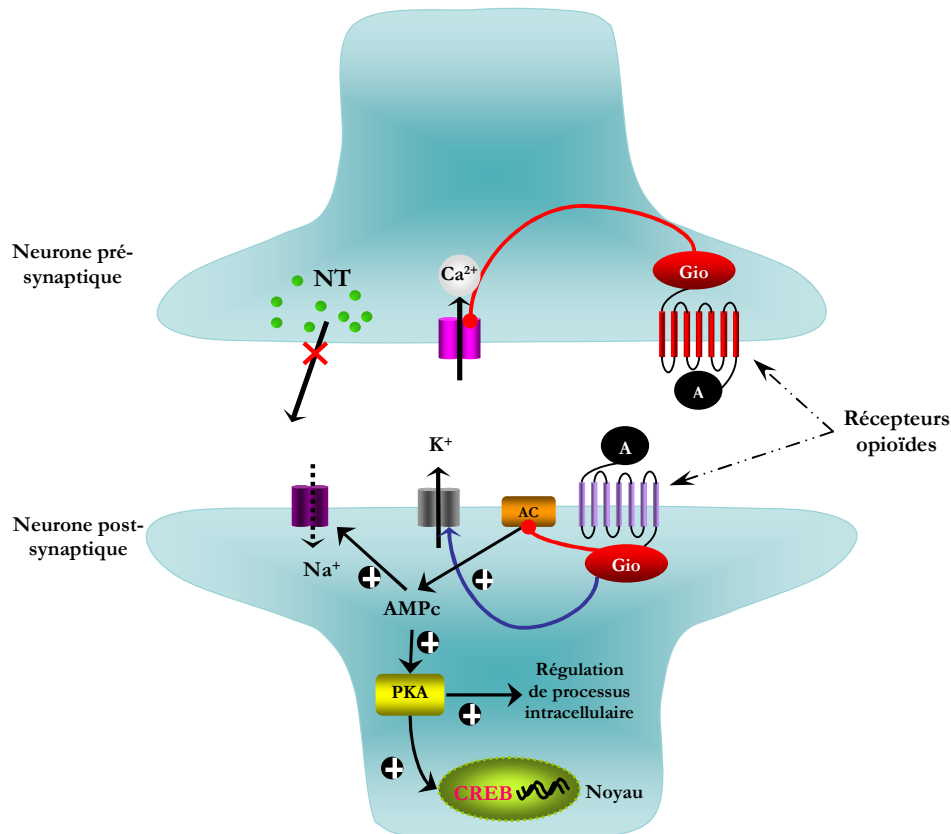


Figure 4. Représentation de quelques voies induites par les protéines Gi une fois les récepteurs opioïdes activés par un agoniste en situation aiguë. Suivant la liaison d'un agoniste (A) au récepteur, les sous-unités $\beta\gamma$ inhibent les canaux calciques voltage-dépendants, empêchant le relâchement de neurotransmetteurs (NT). La stimulation du récepteur amène également la sous-unité α à inhiber l'adénylate cyclase (AC). Habituellement, cette dernière stimule la production d'AMPc, qui à son tour, active la PKA pour finalement mener à l'excitation de CREB. L'AMPc est aussi responsable de l'activité d'un canal sodique voltage-dépendant. Enfin, le complexe $\beta\gamma$ peut, à lui seul, activer les canaux potassiques voltage-dépendants afin d'hyperpolariser le neurone. Flèches rouges = inhibition, flèches bleues = stimulation

1.4.2. Cascade impliquant les MAPK

1.4.2.1 Modules d'activations

On sait également que les récepteurs opioïdes ont la capacité de stimuler la voie ERK (kinase régulant les signaux extracellulaires), mais le mécanisme impliqué n'est pas encore élucidé totalement et il constitue l'un de mes objectifs d'étude. En fait, la voie ERK, appartenant à la famille des protéines kinases activant les facteurs de croissance cellulaire (MAPK), était considérée jusqu'à tout récemment comme une voie exclusive des récepteurs à tyrosines kinases⁷⁸. Cette voie, qui sert d'intermédiaire

à la signalisation nucléaire mais qui est initiée par des récepteurs membranaires, consiste en une cascade d'interactions protéine-protéine, de translocations et de phosphorylations ⁷⁴. Ces protéines phosphorylent et doivent être phosphorylées pour devenir actives. Ainsi, les MAPK sont activées par les MAPKK (MAPK kinase), lesquelles sont activées à leur tour par les MAPKKK (MAPK kinase kinase). Ces trois kinases constituent un modèle de signalisation universel. Elles doivent être phosphorylées au niveau des sérines, thréonines et tyrosines pour être actives. En plus de ERK qui appartient à la famille des MAPK, on retrouve la JNK («c-jun N-terminal kinase») et la p38-MAPKinase, des protéines impliquées dans la réponse cellulaire au stress environnemental qui partagent le même modèle d'organisation ⁷⁹.

Les trois différents modules de MAPKinases comprennent des sous-familles : il y a la sous-famille Raf de MAPKKK qui regroupe 3 protéines, cRaf-1, A-Raf et B-Raf ; la sous-famille MEK de MAPKK formée par MEK1 et MEK2 ; et la sous-famille ERK de MAPK, soit ERK1-2 ⁸⁰. Une fois la protéine ERK active, plusieurs événements peuvent survenir : elle peut phosphoryler un grand nombre de substrats ⁸¹ dont des protéines de sa propre cascade, comme Raf et MEK, pour une rétroinhibition ^{82,83} ; des protéines du cytosquelette ⁸⁴ ou encore des protéines régulatrices des récepteurs couplés aux protéines G, comme les GRK2 ⁸⁵. Dans le cas des récepteurs opioïdes, un des principaux intérêts de leur habileté à stimuler la cascade ERK demeure leur pouvoir de moduler l'expression génétique. En effet, ERK active certains facteurs de transcription ^{86,87}, comme par exemple CREB ⁸⁸ et AP-1, ces derniers étant impliqués dans les effets à long terme des opiacés tels que la dépendance physique et psychologique.

1.4.2.2 Mécanisme d'activation des MAPK par les RCPG

Essentiellement, les RCPG utilisent 4 modes d'activation de ERK : (1) via les seconds messagers, (2) via les sous-unités $\beta\gamma$, (3) via la transactivation des récepteurs à tyrosine kinase ou encore (4) via les β -arrestines ⁸⁹. Les principales voies dépendantes de seconds messagers reconnues pour activer les MAPK sont celles impliquant la PKA et la PKC. Dans les cellules neuronales et hématopoïétiques, l'activation de la PKA subséquente à l'augmentation d'AMPc par une protéine Gs mène à la phosphorylation d'un facteur d'échange Rap-1, une GTPase de la famille Ras, qui active par la suite B-Raf ⁸⁹. Cependant, l'activation de la PKA dans les fibroblastes mène à une inhibition de ERK secondaire à l'inhibition de c-raf-1 ⁹⁰. L'AMPc peut également activer Rap-1 par l'intermédiaire d'Epac, une protéine capable de lier directement l'AMPc qui appartient aux GEF («GTP exchange factor»). Cette protéine active Ras par l'échange d'un GDP pour un GTP ⁹¹. Quant à la PKC, l'activation des MAPK implique la phosphorylation de Raf-1 par la PKC qui a été préalablement activée par la phospholypase C β , elle-même recrutée par la protéine Gq/11. Pour le second mode d'activation des MAPK, le groupe de Wetzker ⁹² fut parmi les premiers à démontrer un lien entre $\beta\gamma$ et ERK. Il semblerait que le dimère $\beta\gamma$, lorsque libéré de G α i, interagissent avec Src ⁹³⁻⁹⁵ et/ou avec la PI3K pour phosphoryler quelques substrats incluant Shc (une protéine adaptatrice) et certains récepteurs à tyrosines kinases ¹. Ces substrats ou récepteurs à tyrosine kinase interagissent avec Grb-2/Sos qui activent à leur tour Ras puis le reste de la cascade ⁸⁰. Tel qu'abordé précédemment, la transactivation des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) figure parmi les modes d'activation des MAPK. Le mécanisme proposé est l'activation de métalloprotéases, qui, à leur tour, actionnent la transactivation des récepteurs à tyrosines kinases par le clivage et la libération des facteurs de croissance

solubles. Ces derniers se lient aux récepteurs à facteurs de croissance afin d'initier une cascade de signalisation ⁹⁶. Enfin, le complexe β -arrestine serait également activateur des MAPK ^{80,97,98}. Une fois en interaction avec les récepteurs, les β -arrestines recrutent, dans l'ordre, Raf-1, MEK et ERK. La β -arrestine interagit également avec la tyrosine kinase c-Src pour activer les MAPK ^{99,100}. À ce moment, seules des protéines cytosoliques sont phosphorylées par ERK car la β -arrestine les restreint à proximité de la membrane, ce qui empêche toute interaction future avec le noyau.

1.4.2.3 MAPK et activation des récepteurs opioïdes

La voie ERK en est une d'importance pour les récepteurs opioïdes. En effet, puisque ERK interagit par moment avec des facteurs de transcription, ceci pourrait expliquer l'effet des opiacés sur la plasticité neuronale, phénomène synonyme de changements permanents dans le fonctionnement de l'encéphale. Les DOR modifient moins la biologie du cerveau que les MOR, ce qui leur confère, encore une fois, un certain intérêt pharmacologique. Cependant, ces effets surviennent plutôt à long terme tel qu'expliqué dans la précédente section. Les modes d'activation empruntés par les récepteurs opioïdes sur la cascade ERK ont été étudiés mais pas totalement élucidés. Belcheva *et al* ¹⁰¹ ont proposé un mécanisme d'activation de ERK différent entre les récepteurs MOR et KOR. Il semblerait que les MOR nécessitent la présence de calmoduline puis de la phospholipase C, laquelle active la PKC ϵ par l'intermédiaire de diacylglycerol pour initier la transactivation des récepteurs EGF (EGFR). Cette dernière étape nécessite les métalloprotéases pour mener à l'activation de la cascade MAPK ¹⁰². Quant aux récepteurs KOR, l'activité de la voie ERK débute via l'activation des sous-unités $\beta\gamma$. Celles-là stimulent la PI3K, ce qui génère alors le phosphoinositol-3-phosphate (PIP₃) dans le but de mener à l'activation de la PKC ζ et

enfin de ERK ¹⁰². Le groupe de Kramer ¹⁰³ a démontré que les DOR, au contraire des MOR, ne requièrent en aucun cas la transactivation des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) pour stimuler ERK. Cette observation fut contredite par le groupe de Schulz ¹⁰⁴ qui étudiait le même type cellulaire. Ils affirment que la transactivation des EGFR est nécessaire pour activer ERK et survient via la stimulation des métalloprotéases ¹⁰⁴. Cette transactivation pourrait également impliquer la tyrosine kinase c-Src puisque en utilisant l'inhibiteur spécifique de Src, PP2, ils arrivent à démontrer une diminution de la quantité de ERK phosphorylées à l'électrophorèse (ERK phosphorylée correspond à la forme active de la protéine). Le problème majeur avec cette conclusion réside au niveau de la concentration d'inhibiteur d'EGFR. Pour arriver à prouver l'implication des récepteurs à EGF, ils les ont inhibé en utilisant une concentration si élevée qu'il n'est pas exclu que les tyrosines kinases non-réceptrices soient du même coup inhibées. Enfin, Kramer et Simon ¹⁰⁵ ont établi que les récepteurs opioïdes ne devaient pas forcément être internalisés pour activer la cascade MAPK, une restriction initialement proposée par le groupe de Pierce ¹⁰⁶.

1.5. Tyrosines Kinases

Les tyrosines kinases ont été abordées brièvement dans les sections précédentes et nous avons vu qu'elles pouvaient être des effecteurs des RCPG aussi bien que des intermédiaires dans la cascade des MAPK. Dans cette section, un aperçu général de ce type de protéine sera vu pour faire place au thème principal qu'est le rôle des tyrosines kinases non réceptrices dans la régulation de la signalisation des RCPG.

1.5.1. Familles et fonctions des tyrosines kinases

Les protéines tyrosine kinases (PTK) catalysent la phosphorylation de résidus tyrosines. Il y a deux classes majeures à ce type d'enzyme : les protéines kinases réceptrices (i.e. EGFR) et les protéines kinases non-réceptrices, soit la catégorie dont font partie les tyrosines kinases de la famille de Src. Ces enzymes s'impliquent dans plusieurs voies de signalisation cellulaire et sont la clé de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, l'effet anti-apoptotique ainsi que la croissance des neurites. Une mauvaise régulation de ces enzymes, comme par exemple l'introduction de certaines mutations à l'intérieur de leur séquence aminée ou encore une élévation de leur expression, peut mener à diverses formes de cancer

107,108

1.5.2. Structure des familles de protéines tyrosines kinases

Les PTK réceptrices possèdent un domaine de liaison extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine catalytique intracellulaire. Le domaine transmembranaire ancre la protéine à l'intérieur de la membrane plasmique, alors que le domaine extracellulaire a pour fonction de lier les facteurs de croissance. Il existe plusieurs motifs structuraux pour ces domaines extracellulaires. L'activation des récepteurs s'effectue une fois qu'un ligand s'est lié au domaine extracellulaire, ce qui prévaut pour les RCPG. Ceci a pour effet d'induire la dimérisation de deux récepteurs à proximité. Les récepteurs maintenant actifs sont capables d'autophosphoryler les résidus tyrosines extérieurs à leur domaine catalytique par une trans-phosphorylation. Le but de ce processus est de stabiliser le récepteur dans une conformation active et de créer des sites de liaisons phosphotyrosines pour des protéines transductrices de signaux. Les protéines qui se lient aux domaines intracellulaires des récepteurs à tyrosines kinases pour entraîner la signalisation sont

la petite protéine G RasGAP, la PI3K, la PLC γ , la phosphotyrosine phosphatase SHP et certaines protéines adaptatrices comme Shc, Grb2 and Crk.

Au contraire des PTK-réceptrices, les protéines kinases non-réceptrices sont localisées dans le cytoplasme, le noyau ou sont ancrées au feuillet interne de la membrane plasmique. Il existe 8 familles différentes de tyrosines kinases non-réceptrices : SRC, JAK, ABL, FAK, FPS, CSK, SYK et BTK. Dans chacune de ces familles, plusieurs membres ont été identifiés. À l'exception du domaine kinase homologue («Src Homology 1», ou domaine SH1) et de certains domaines d'interaction protéines-protéines (domaines SH2 et SH3), ces différentes familles ont peu de caractéristiques structurales communes.

1.5.3. SFK, leur expression, en particulier c-Src

SFK est l'acronyme de «Src-family protein tyrosine kinase». Cette famille comprend 9 membres, soit c-Src, Fyn, Yes, Lck, Lyn, Hck, Fgr, Blk et Yrk. Ces enzymes sont étroitement régulées pour éviter des dommages irréversibles aux organismes qui les contiennent (i.e. initier un cancer, tel que mentionné plus haut). Ainsi, des interactions intramoléculaires de leur domaine fonctionnel les maintiennent dans une conformation inactive.

Voilà plus de 25 ans que le proto-oncogène c-Src, premier membre identifié des SFK, fut découvert. On sait maintenant que la protéine Src est retrouvée de façon ubiquitaire dans les cellules des vertébrés et que son expression est plus forte dans le cerveau, les ostéoclastes ainsi que les plaquettes¹⁰⁹. Ceci suggère alors que Src prendrait part à divers processus autres que la division cellulaire puisque les

plaquettes sont anucléées, et par conséquent, dépourvues de pouvoir mitotique alors que les neurones sont des cellules post-mitotiques.

1.5.4. Src – domaines majeurs, formes actives et inactives

La protéine Src possède 3 domaines majeurs : un domaine kinase catalytique nommé SH1 (pour Src Homology 1) ; un domaine reconnaissant les résidus tyr phosphorylés nommé SH2 (pour Src Homology 2) qui est impliqué dans la formation de plusieurs complexes de signalisation ^{110,111}; et enfin un domaine se nommant SH3 (pour Src Homology 3) qui reconnaît des motifs polyprolines ¹¹⁰. SH2 et SH3 prennent part aux interactions protéines-protéines alors que le domaine kinase catalytique contient le site kinase actif. Src se retrouve sous 2 formes, inactive et active, des formes rigoureusement contrôlées pour les raisons mentionnées précédemment. Il existe 2 sites de phosphorylation majeurs sur Src et la phosphorylation de ces sites est responsable de leurs différentes formes (actives ou inactives). Le premier site se situe au niveau de la tyrosine #416 (Y416) de la séquence aminée. Sa phosphorylation permet de maintenir Src selon sa forme active. L'activation de c-Src s'initie par une interaction protéine-protéine entre les domaines SH2 et SH3 pour enfin mener à l'autophosphorylation de la Y416 qui stabilise la forme active. Tous ces événements libèrent la poche de liaison, permettant à un substrat d'y accéder. Le second site, plus critique, se situe au niveau de la tyrosine #527. La phosphorylation et la déphosphorylation sont régulés par diverses protéines telles que des kinases CSK (phosphorylent) ¹¹² ou des phosphorylases SHP-1 (déphosphorylent). En fait, la phosphorylation de la Y527 inactive Src car ce résidu, une fois phosphorylé, modifie la conformation de la protéine pour que le domaine SH2 interagisse avec Y527, rendant le site de liaison inaccessible aux substrats. La

déphosphorylation de la Y527 relâche cette liaison et ramène Src sous une forme active (voir figure 5).

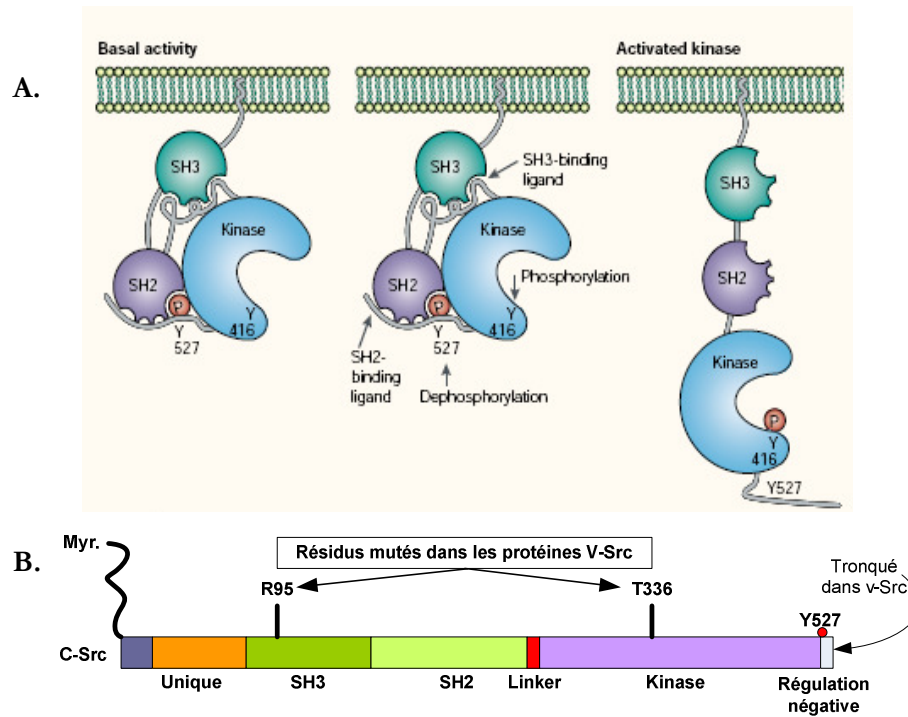


Figure 5. Schématisation de l'organisation structurale des SFK. A. Représentation des formes actives et inactives de Src. À gauche - Conformation inactive refermée des SFK stabilisée par l'interaction du domaine SH2 avec la tyrosine 527 (Y#527) phosphorylée afin de positionner le domaine SH3 avec le domaine «linker». Au centre - Illustration (à l'aide des flèches) des différents mécanismes impliqués dans l'activation de Src. À droite - Conformation active ouverte des SKF stabilisée par la phosphorylation de la tyrosine 416 (Y#416) **B. Structure des domaines des kinases SFK.** Les membres de cette famille possèdent un domaine conservé «unique» qui inclut un segment N-terminal myristoylé. Il y a aussi un domaine SH3 suivi d'un domaine SH2, d'un domaine de liaison «linker», d'un domaine catalytique kinase et d'une courte queue C-terminale. Les résidus mutés dans la forme v-Src sont identifiés ainsi que le résidu Y#527 responsable de la forme active. *Adaptée de Martin (2001)¹¹³ et de Parsons & Parsons (2004)¹¹⁴*

1.6. Régulation de l'efficacité de signalisation et rôle de Src dans la régulation des DOR

Suivant la liaison d'un agoniste à un récepteur opioïde, des mécanismes de régulation intracellulaire que l'on nomme désensibilisation s'enclenchent pour que l'effet ne dure pas indéfiniment. Plusieurs protéines participent à ces mécanismes de régulation, comme par exemple la tyrosine kinase Src. Aussi, l'exposition chronique des récepteurs opioïdes aux analgésiques ou aux drogues d'abus induit le phénomène de tolérance, ceci signifiant qu'il faut accroître les doses pour obtenir les effets recherchés quels qu'ils soient. Au niveau moléculaire, la tolérance se définit comme étant un processus de désensibilisation lui-même expliqué par une diminution de la capacité du récepteur d'induire un signal lorsqu'activé par un agoniste.

1.6.1. Désensibilisation des RCPG

Pour que l'effet du ligand sur le récepteur cesse, ce dernier doit être inactivé par la phosphorylation de résidus sérines et/ou thréonines localisés du côté cytoplasmique au niveau de l'extrémité C-terminale et de la 3^e boucle intracellulaire. Ce sont les protéines kinases dépendantes de seconds messagers (tels PKA ou PKC) ou les kinases couplées aux récepteurs à protéines G (GRK) qui viennent phosphoryler le récepteur ¹¹⁵ lorsqu'il adopte la conformation adéquate reconnue par les kinases ¹¹⁶. Lors du processus de désensibilisation homologue, les GRK, en plus de phosphoryler le récepteur, augmentent l'affinité de la β -arrestine pour le récepteur, soit la prochaine protéine à intervenir dans le processus de régulation du récepteur. La β -arrestine vient alors se lier à l'extrémité C-terminale du récepteur ou au niveau de la 3^e boucle, ce qui enclenche le mécanisme de désensibilisation ¹¹⁷. Ceci entraîne le découplage du récepteur et des protéines G, un mécanisme physiologique

important de rétrocontrôle qui a pour but de protéger la cellule d'une éventuelle sur-stimulation aiguë ou chronique. Les β -arrestines participent également à l'endocytose du RCPG via des vésicules tapissées de clathrine. Ce processus requiert également la présence de la dynamine ¹¹⁸ et de l'AP-2. Cette dernière est une protéine adaptatrice, qui, à travers la β -arrestine, permet de relier le récepteur à l'endocytose. Une fois séquestrées à l'intérieur de la cellule, ces vésicules fusionnent avec des endosomes et à ce moment, les récepteurs peuvent être soit déphosphorylés et recyclés à la surface cellulaire, soit acheminés vers un lysosome où ils seront dégradés par protéolyse ^{2,117}. Ils peuvent également être dégradés dans un protéasome sans nécessairement être ubiquitiné, un mécanisme propre aux DOR ¹¹⁹. Lorsque le récepteur est recyclé, une réassociation avec les protéines G est nécessaire avant qu'il soit à nouveau stimuable par un ligand (c.f. figure 6).

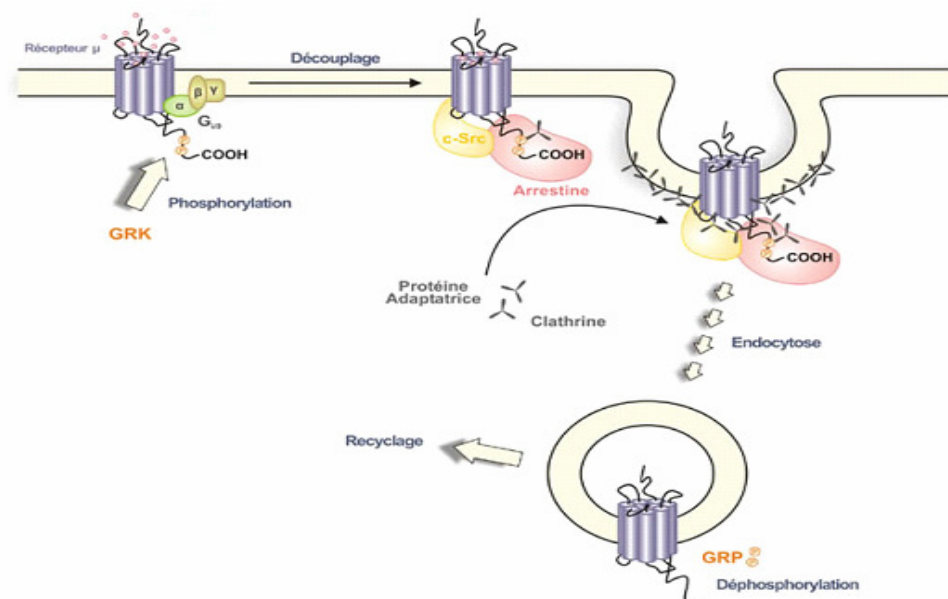


Figure 6. Schématisation du mécanisme de désensibilisation homologue des récepteurs μ (voir texte pour description du mécanisme). Ces derniers sont internalisés lorsqu'ils sont stimulés par la méthadone, l'éthorphine ou le DAMGO. Par contre, la morphine n'entraîne pas l'internalisation des récepteurs MOR – *Figure adaptée de Williams et al 2001* ⁷⁴

1.6.2. Activité de Src et phosphorylation des résidus TYR des RCPG

La phosphorylation des récepteurs par les kinases est reliée au processus d'internalisation. Cependant, à travers l'ensemble des RCPG, il n'y a aucune unanimité concernant les mécanismes empruntés pour l'internalisation. Trapaidze et collègues ¹²⁰ ont établi que la modulation de la PKA ou de la PKC ne modifiait pas l'internalisation des récepteurs, observations qui demeurent contestées par certains. Selon eux, les kinases ne sont pas essentielles au processus d'internalisation pour les récepteurs opioïdes mais utiles pour le découplage. Cette conclusion est en partie basée sur des expériences faites avec les récepteurs β 2-adrénergiques dont la protéine responsable de l'internalisation est la β -arrestine et non les kinases β -adrénergiques (nommées également GRK) ¹²⁰. Par la suite, le groupe de Trapaidze ¹²¹ a démontré que la mutation des sérines 344 et 363 dans la portion C-terminale du récepteur delta diminuait significativement le processus d'internalisation sans toutefois l'inhiber complètement, alors que l'amputation de la portion C-terminale du récepteur pouvait inhiber totalement ou partiellement l'internalisation du récepteur selon le type cellulaire ¹²². Kramer *et al* ¹²³ se sont par la suite intéressés à l'étude du rôle des résidus tyrosines, également phosphorylables, dans le mécanisme d'internalisation des DOR. En inhibant les SFK par l'inhibiteur spécifique PP1, son groupe a observé que le processus d'internalisation suivant la liaison d'un agoniste était compromis et qu'il y avait une diminution de l'activité de la cascade MAPK ¹²³. Ils ont poursuivi leurs recherches pour étudier le rôle d'un résidu tyrosine spécifique (i.e. Y#318) du domaine NPXXY à proximité de la portion C-terminale. Suite à leurs expérimentations, ils conclurent que le remplacement de la tyrosine 318 par une phénylalanine atténuait le processus d'internalisation via les vésicules tapissées de clathrines et réduisait l'activation des MAPK ¹²⁴. Selon eux, ces observations

viendraient davantage appuyer l'implication d'une SFK et la phosphorylation du domaine NPXXY dans ces mécanismes de régulation des récepteurs. Par contre, le rôle du domaine NPXXY dans l'internalisation est controversé puisque des mutations similaires dans le même domaine appartenant à d'autres RCPG ne modifient pas leur internalisation mais interfèrent avec leur signalisation. Ces données suggèrent donc que le domaine NPXXY serait essentiel au maintien de la structure globale des récepteurs ¹²⁵. Une explication alternative des résultats par Kramer et collègues pourrait être que la mutation de la tyrosine du motif NPXXY modifie la capacité des DOR à activer les SFK nécessaires au processus d'endocytose. Cette assumption est supportée par le fait que les mutants des récepteurs DOR n'activent plus la cascade MAPK et Src prendrait part à cette étape (cf résultats).

1.6.3. Src régule différentes étapes du processus d'internalisation

Dans les mécanismes de désensibilisation homologue classique, les protéines kinases de RCPG sont importantes pour promouvoir le recrutement des β -arrestines au récepteur ainsi que le découplage du récepteur et des protéines. Le groupe de Sarnago ¹²⁶ a démontré, sur des cellules HEK-293 transfectées de façon stable avec les récepteurs β 2-adrénergiques, que les GRK-2 étaient régulées par la protéine c-Src. En fait, la stimulation des récepteurs β 2-adrénergiques par un agoniste mène à une phosphorylation rapide des résidus tyrosines des GRK-2, suggérant que GRK-2 est une cible pour la tyrosine kinase c-Src et cela peut avoir un rôle important dans l'activité kinase ainsi que la dégradation des GRK2 ¹²⁶. Le groupe de Fan ¹²⁷ a complété ces observations en démontrant que la stimulation du récepteur β 2-adrénergique par un agoniste recrute Src via un mécanisme inconnu. À ce moment, la GRK vient s'accoler sur la queue C-terminale du récepteur et doit être phosphorylée

par c-Src pour à son tour phosphoryler le récepteur au niveau des résidus sérines/thréonines ¹²⁷. Ensuite, la β -arrestine, en s'arrimant au récepteur, enclenche la machinerie cellulaire impliquée dans l'endocytose des RCPG. En fait, elle sert de tremplin à l'interaction du RCPG et des protéines responsables de l'endocytose, soit la clathrine et AP-2.

Les termes internalisation, séquestration et endocytose s'avèrent être synonymes et ils signifient que le récepteur est retiré de la membrane cellulaire par un compartiment intracellulaire appelé endosome pour y subir un recyclage ou une dégradation. Trois moyens d'internalisation sont reconnus : il y a par la formation de vésicules tapissées de clathrine, par les caveolae ou encore par des vésicules non tapissées de clathrine. Cependant, les vésicules tapissées de clathrine sont les plus étudiées. Brièvement, voici le mécanisme : une fois que les GRK ont phosphorylé le récepteur et que la β -arrestine est venue se lier au complexe, l'invagination de la membrane s'accroît. Le recrutement de la clathrine du côté du cytosol se fait par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice AP-2 ou directement par la β -arrestine. À ce moment, une grosse GTP-ase, la dynamine, vient se lier au complexe pour refermer le puit tapissé de clathrine contenant le récepteur et mener à la formation d'une vésicule. L'ensemble de ces différentes protéines paraît être régulé par la tyrosine kinase Src, ou enfin, par des membres de cette famille. Rien n'a encore été démontré à l'aide des récepteurs opioïdes, mais des études ont été produites sur les récepteurs β 2-adrénergiques, sur les récepteurs à angiotensine ^{128,129} ainsi que les récepteurs à neurokinine 1 (NK-1R)¹³⁰. Tel que discuté précédemment, Src active la GRK en la phosphorylant ¹²⁷. C-Src interagit également avec la β -arrestine. Il a été établi que les β -arrestines recrutent la tyrosine kinase c-Src au récepteur ⁹⁹ et cela pourrait faciliter

la régulation par c-Src de certaines protéines accessoires pour le processus d'internalisation. Le groupe de Ahn ¹³¹ a démontré que la phosphorylation de la dynamine par c-Src était requise pour mener à l'internalisation du récepteur β 2-adrénergique et que ce processus était régulé par la stimulation du récepteur. En ce qui a trait à la protéine adaptatrice AP-2, le groupe de Laporte ¹³² avait remarqué, suite à la stimulation des récepteurs β 2-adrénergiques, que la formation de vésicules tapissées de clathrine dépendait d'AP-2, et que cette dernière interagissait avec la β -arrestine via sa sous-unité β 2-adaptine. Son groupe a par la suite établi que c-Src régula la dissociation d'AP-2 de la β -arrestine du récepteur à angiotensine II de type 1 afin que le processus d'internalisation via les vésicules tapissées de clathrine se poursuive ¹²⁸. Enfin, le groupe de Wilde ¹³³ a démontré que l'endocytose des récepteurs EGF nécessitait la présence de la kinase c-Src pour l'activation de la clathrine et sa redistribution.

1.7. Projet de recherche

Il a déjà été démontré que les protéines tyrosines kinases non réceptrices étaient impliquées dans la régulation de différentes étapes du processus de désensibilisation homologue de certains récepteurs. Cependant, l'habileté des récepteurs delta opioïdes d'induire l'activité des kinases de la famille de Src et la participation de ces kinases à la désensibilisation des récepteurs n'ont pas encore été clairement démontrées. À ce jour, la seule évidence suggérant que les DOR puissent stimuler les kinases Src est indirecte et implique l'activation de la cascade ERK. Par contre, ce mécanisme demeure controversé car certaines études suggèrent que l'activation de ERK est imputable aux récepteurs à tyrosines kinases plutôt qu'à Src.

En fait, cette controverse est associée à l'utilisation de fortes doses d'inhibiteurs de tyrosines kinases réceptrices, et par conséquent, à la possible perte de spécificité du traitement. Ainsi, les objectifs de mon projet étaient :

1. d'établir les mécanismes d'activation de la cascade ERK par les DOR,
2. d'évaluer si la kinase Src participe à cette cascade et
3. le cas échéant, de déterminer si Src joue également un rôle dans la régulation de la réponse ERK une fois les DOR exposés à des ligands sélectifs.

Enfin, l'ensemble des manipulations expérimentales ont été effectuées à l'aide de cultures cellulaires HEK 293 et les détails sont précisés dans la section suivante.

2. MATÉRIEL & MÉTHODOLOGIE

2.1 Réactifs

Les réactifs chimiques et tampons, les inhibiteurs de protéase, le DPDPE (D-Per-2,5-enkephaline), la forskoline, l'isobutylmethylxanthine, la toxine pertussique (PTX) ainsi que le saccharose proviennent de chez Sigma-Aldrich. Le 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2) sont fournis par VWR, l'albumine de sérum bovin provient de EMD Chemicals alors que l'adénosine [^3H] est fournie par PerkinElmer Life Sciences. Le G418 (geneticine), DMEM, sérum de bovin fœtal, la glutamine, la pénicilline et la streptomycine proviennent de chez Wisent.

2.2 Constructions d'ADN

L'ADNc du récepteur humain DOR a été cloné à l'aide du vecteur d'expression pcDNA3 (Invitrogene) tel que décrit précédemment¹³⁴. Le codon STOP de ce récepteur, situé à l'extrémité C-terminale, a été muté à l'aide d'une trousse de mutagenèse Clontech afin d'y introduire une séquence codante pour l'épitope FLAG (DYKDDDDK). Cet épitope est combiné à un peptide signal qui s'avère être une séquence modifiée de l'héماغlutinine du virus de l'influenza¹³⁵. En fait, l'utilisation d'anticorps dirigés vers ces peptides permet de mettre en évidence le récepteur sans en modifier les propriétés de signalisation par rapport au type sauvage sans épitope^{136,137}. Le construit d'ADN a été vérifié par une enzyme de restriction chargée de recenser la séquence nouvellement formée. Ces cellules, exprimant FLAG-DOR, ont été utilisées pour les expériences portant sur l'étude des mécanismes d'activation de la kinase ERK. L'ADNc du récepteur murin DOR a été

cloné à l'aide du même vecteur d'expression, soit le pcDNA3, mais l'épitope FLAG a été introduit au niveau de l'extrémité N-terminale (FLAG-DOR). Les cellules exprimant ce récepteur ont été utilisées pour les expériences portant sur les mécanismes de désensibilisations des récepteurs. Le récepteur murin DOR tronqué a été créé suite à la production d'un codon STOP après le résidu 344 de la séquence codante. En fait, la mutation d'un oligonucléotide a été engendrée au site du résidu 344. L'ADNc ainsi formé par la réaction en chaîne d'une polymérase amène la formation d'un récepteur tronqué (DOR344T)¹³⁸. L'ADNc du récepteur a été cloné à l'aide du vecteur d'expression pcDNA3 (Invitrogen). Ce récepteur provient du laboratoire du Pr. M. von Zastrow (Université de Californie, San Francisco). Le mutant dominant négatif de Src (DNM-Src : K295R/Y527F) provient du laboratoire du Pr. Bouvier (Université de Montréal, Montréal).

2.3 Culture cellulaire et transfections

L'ADNc du récepteur de type sauvage ou tronqué (DOR344T) a été incorporé dans des cellules HEK 293 à l'aide de lipofectamine et d'un vecteur d'expression pcDNA3 (Invitrogen). Ces types cellulaires exprimaient de façon stable le récepteur et possédaient l'épitope FLAG aux sites décrits dans la section 2.2. Les cellules exprimant l'un ou l'autre de ces 2 types de récepteurs ont été sélectionnées à l'aide de 500µg/ml de G418. En ce qui a trait aux transfections transitoires effectuées à l'aide de polyéthylénimine, le récepteur DOR a été co-exprimé avec le mutant dominant négatif de c-Src ou encore avec le vecteur vide pcDNA3. Puisque le vecteur d'expression pour DNM-Src augmente l'expression du FLAG-DOR, la quantité de récepteur exprimée a été titrée afin d'obtenir un niveau d'expression du récepteur similaire entre les différentes conditions. Ainsi, 6µg de FLAG-DOR ont été

transfectés avec 6µg de pcDNA3 ou 2µg du FLAG-DOR combiné avec 10µg de DNM-Src. Le niveau d'expression des récepteurs a été vérifié via des études de radio-liaison avec du Naltrindole [^3H] ou par ELISA. Enfin, les cellules ont été cultivées en mono-couche dans des flasques contenant du milieu DMEM enrichi de 10% (v/v) de sérum de bovin fœtal, 5mM de glutamine, 1000 unités/ml de pénicilline et 1mg/ml de streptomycine. L'atmosphère nécessaire au maintien des différentes lignées était à 37°C et contenait 5% de CO_2 .

2.4 Accumulation d'AMPc

Les cellules furent incubées au moins 16 heures en présence d'adénine [^3H] (1µCi/ml; 1Ci = 37GBq) dans du DMEM supplémenté de 10% FBS afin de maximiser leur intégrité pour l'expérience. Lorsque nécessaire, une fois l'incubation de 16h terminée, les cellules ont été désensibilisées pendant 30 minutes au DPDPE 1µM, puis mécaniquement détachées du flasque et lavées 3 fois dans du PBS à 4°C. La viabilité cellulaire fut déterminée à l'aide d'une coloration au bleu de trypan (mortalité toujours faible, < 5%). Entre 4,5-5 X10⁵ cellules ont été suspendues dans du PBS contenant 25µM de forskolin et 2.5µM de IBMX avec des concentrations croissantes de DPDPE (0-10µM). Les cellules ont par la suite été incubées 20 minutes à 37°C. La réaction a été cessée au moment de l'addition de 5% d'acide trichloroacétique, de 5mM d'ATP et de 5mM d'AMPc. L'ATP- ^3H] et l'AMPc- ^3H] ont été séparés par chromatographie séquentielle sur colonnes de résine Dowex et sur colonnes de résine d'oxyde d'aluminium (Alumine). En ce qui concerne les expériences où une inhibition pharmacologique de Src a été effectuée, les cellules ont été pré-traitées pendant 1 heure avec 20µM de PP2 ou de son véhicule DMSO (diméthyl sulfoxyde) avant le traitement au DPDPE, puis le reste de l'expérience a été

poursuivi tel que décrit précédemment. Lorsqu'un traitement au saccharose a été effectué, les cellules sont pré-incubées en présence de 0.4M de saccharose pendant 2 heures et ce traitement perdure même en présence de PP2 et/ou de conditions désensibilisantes au DPDPE 30 minutes. Les résultats ont été exprimés en ratio $\text{AMPC-}[^3\text{H}]/(\text{AMPC-}[^3\text{H}] + \text{ATP-}[^3\text{H}])$. L'effet de l'agoniste DPDPE sur la production d'AMPC a été exprimé en % de changement par rapport à la production d'AMPC en absence de ligand (i.e. niveau basal). Lorsque l'action de l'agoniste est comparé entre différentes conditions (i.e. suivant la désensibilisation ou l'utilisation de saccharose), les résultats ont été normalisés par rapport à l'effet du DPDPE observé dans les conditions contrôles correspondantes.

2.5 Immunobuvardage et SDS-PAGE

Afin de déterminer l'activation de ERK1/2, des cellules ont été mises en culture dans des plaques à 6 puits jusqu'à ce que ces derniers contiennent environ 250 000 cellules. Les cellules ont été incubées dans du DMEM contenant 10% de sérum de bovin fœtal, 1mM de glutamine, 500 unités/ml de pénicilline et 500 unités/ml de streptomycine. Ces plaques ont été préparées 72 heures avant l'addition d'agoniste. Ensuite, 20 heures avant l'addition du DPDPE 1 μ M, le milieu de culture a été retiré des plaques puis remplacé par du sérum sans facteur de croissance. L'utilisation d'un tel milieu diminuerait le niveau d'activité basale de la voie MAPK dépendante des facteurs de croissance⁹⁵. Afin d'étudier la cascade de signalisation liée à la stimulation de ERK, nous avons pré-traité les cellules 16h avec la toxine pertussique à 100ng/ml ou encore nous avons effectué un pré-traitement de 30 minutes le jour même de l'expérience avec du Ag1478 100nM, du Ag1295 100nM ou

encore avec de la wortmannine 1 μ M (cf section résultat pour explications). Lors d'expériences portant sur la désensibilisation du récepteur, les cellules ont été pré-traitées 30 minutes avec du DPDPE 1 μ M en présence ou absence de PP2 (1h) aux concentrations indiquées, et ce à 37°C. L'arrêt du traitement est survenu suite à 3 lavages au PBS 4°C. Les cellules ont ensuite été lysées dans du tampon de prélèvement (Tris-HCl 62.5mM, pH 6.8, 10% Glycérol, 5% sulfate dodécyl de sodium (SDS), 0.5% de bleu de bromophénol, 50mM dithiothreitol (DTT)) puis chauffées 5 minutes à 95°C et enfin soniquées. Les protéines ont été déposées sur un gel d'entassement de 4% d'acrylamide puis séparées sur un gel 9% d'acrylamide. Ensuite, elles ont été transférées 2h à 250mA et 110V sur des membranes de nitrocellulose. Ces membranes ont ensuite subi un blocage pendant une heure à température ambiante dans une solution de blocage (5% de lait en poudre non-gras et 0.25% BSA). L'anticorps p-ERK monoclonal de souris (p-ERK, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a été ajouté aux membranes (dilution 1 : 500 dans la solution de blocage) pour une exposition d'une nuit à 4°C. Après 3 rinçages de 10 minutes dans une solution de TBS (25mM Tris et 150mM NaCl, pH 7.4)-Tween 0.5%-solution de blocage, les membranes ont été exposées 60 minutes à température ambiante à l'anticorps anti-souris lié à la peroxidase de raifort (1 : 4000 dans la solution de blocage). La nitrocellulose a été à nouveau lavée 3 fois dans du TBS-Tween 0.5%-solution de blocage pour supprimer les liens non-spécifiques des anticorps. La détection des protéines immunoréactives a été effectuée à l'aide d'une solution chimioluminescente pour le transfert de type Western sensible à la peroxidase de raifort (Perkin Elmer Life Sciences). Afin d'établir le ratio ERK phosphorylé / ERK total (quantité de protéines ERK activée par rapport à la quantité totale), la quantité totale de protéines ERK doit être établie. Les membranes

doivent donc être lavées des anticorps liés à leur surface. Une fois les lavages achevés, les membranes de nitrocellulose ont été à nouveau exposées à un anticorps (dilution 1 : 5000 dans solution de blocage) qui reconnaît toutes formes confondues de la protéine (ERK total, Santa Cruz Biotechnology). Ensuite, un anticorps polyclonal de lapin (1 : 20 000 dans une solution de blocage, Amersham Pharmacia Biotechnologies) fut utilisé pour reconnaître l'anticorps spécifiquement lié à toute forme de ERK. La détection de protéines immunoréactives a été répétée et la quantification des protéines a été faite par analyse densitométrique MCID.

Pour vérifier l'activation de Src, les cellules ont été mises en culture dans des pétris de 100 mm et été préparées tel que décrit pour l'activation de ERK1/2. Après le traitement au DPDPE 30 minutes, les cellules ont été lavées, recueillies et solubilisées dans un tampon RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% triton X100, 0,25% d'acide désoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptine, 5 µg/ml d'inhibiteur soybean trypsin, 10 µg/ml benzamidine, 1 µg/ml aprotinine, 1 mM Na_3VO_4) à 4°C pour 90 minutes. Ensuite, les cellules ont été centrifugées pour concentrer les débris non-solubilisés à 12 000 g pendant 20 minutes, puis le culot a été suspendu dans un tampon de SDS pour ensuite être séparé sur un gel SDS-PAGE. L'anticorps monoclonal anti-phospho-Src (Y416) a été utilisé à une dilution de 1 : 1000 (Cell Signaling) pour déterminer la présence de Src activé alors que la quantité totale de protéine Src a été détectée via l'anticorps polyclonal anti-Src (SRC2 : sc-18; 1:5000; Santa Cruz Biotech).

2.6 ELISA

Les analyses ELISA liées à mon projet de recherche ont été effectuées par Nicolas Audet et Élodie Archer-Lahlou, tous deux des membres de mon laboratoire. Brièvement, la mesure de la quantité de récepteurs à la surface cellulaire a été effectuée à l'aide de la technique ELISA adaptée à partir des expériences du groupe de Lavoie ¹³⁹ ainsi que du laboratoire du Pr Bouvier ¹⁴⁰. Les cellules ont été ensemencées à une densité de 10^5 cellules par puits à l'intérieur de plaques de 24 puits enrobés de polylysine (pendant 48h). Le jour de l'expérience, le DPDPE $1\mu\text{M}$ a été introduit dans un nouveau milieu d'incubation contenant du DMEM/hepes 20mM aux temps indiqués sur la légende des figures. Lorsque le PP2 $20\mu\text{M}$ ou le saccharose (0.4M) ont été utilisés, ces pré-traitements ont été respectivement introduits 1h et 3h précédant l'ajout de l'agoniste. La réaction d'internalisation fut cessée par l'addition de PBS froid. Après 3 lavages au PBS, les cellules ont été fixées par du paraformaldéhyde 3% pendant 15 min à 4°C et les liaisons non-spécifiques ont été bloquées suite à l'incubation des cellules dans une solution de PBS/BSA 1%/CaCl₂ 1mM à température pièce pendant 30 minutes. Ensuite, les cellules ont été incubées 1 h à température pièce avec l'anticorps anti-Flag M1 (1 : 1000; Sigma-Aldrich), puis lavées 3 fois avant d'être exposées 30 minutes à un anticorps anti-murin conjugué à la peroxydase (HRP; 1:8000; Amersham Biosciences). Subséquemment, 200 μl de substrat HRP o-phenylenediamine dihydrochloride (SIGMA FAST™ OPD, sigma Aldrich) ont été ajoutés dans les différents puits. Après 8 minutes d'exposition à ce substrat, la réaction a été cessée par l'addition de HCL 3N. 200 μl du mélange formé dans les différents puits ont été transférés dans une plaque de 96 puits en triplicata afin de mesurer la densité optique (DO) de la solution à une longueur d'onde de

492nm. L'appareil de mesure utilisé fut un lecteur de micro-plaque Victor 3 produit par la compagnie Perkin Elmer. La lecture de la densité optique correspond au signal généré par les récepteurs demeurés à la surface cellulaire. La quantité de récepteurs internalisés suivant l'exposition au DPDPE 1 μ M est calculée en soustrayant la densité optique obtenue en présence de l'agoniste de celle obtenue en son absence. Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de récepteurs initialement présents à la surface cellulaire qui ont été internalisés via la formule suivante : $100 \times (\text{DO}_{\text{basale}} - \text{DO}_{\text{stimulée}}) / (\text{DO}_{\text{basale}})$ où $\text{DO}_{\text{basale}}$ et $\text{DO}_{\text{stimulée}}$ correspondent au signal obtenu en présence ou absence de DPDPE respectivement. Lorsque l'internalisation en présence d'un agoniste est comparée avec différents traitements expérimentaux (i.e. suivant un pré-traitement au PP2 et/ou saccharose), les résultats ont été normalisés selon l'internalisation maximale induite par le DPDPE dans la condition non-traitée.

2.7 Analyse statistique

Les analyses statistiques et l'ajustement des courbes sont effectués à l'aide de la version 4 du logiciel Graph Pad Prism (GraphPad, San Diego, CA).

3. RÉSULTATS

3.1. Étude de l'activation de ERK par les DOR

3.1.1. La phosphorylation de ERK suivant la stimulation de DOR est dépendante des protéines Gi/o

Il a déjà été démontré que les agonistes DOR stimulaient la voie de signalisation impliquant la MAPK ERK^{104,105}. Toutefois, le mécanisme par lequel cette kinase est activée demeure insaisissable. En fait, des doutes persistent quant à la nécessité de la transactivation de RTK ou quant à l'activation de la tyrosine kinase Src pour stimuler ERK. Ainsi, l'agoniste sélectif DPDPE a été utilisé dans des essais d'activation des MAPK afin de quantifier son effet sur la cascade de signalisation menant à la stimulation de ERK. Des anticorps reconnaissant les formes phosphorylées actives (anti-p-ERK 1/2) (fig 7A) et l'ensemble des protéines ERK (anti-ERK1/2) ont été utilisés pour cette expérience ainsi que des cellules HEK293 exprimant de façon stable DOR de type sauvage. Ces cellules avaient été préalablement exposées ou non à une dose maximale de l'agoniste DPDPE 1 μ M pendant 5 minutes, soit une dose maximale). Une analyse par densitométrie a permis d'estimer le ratio p-ERK 1/2 sur la quantité totale de ERK 1/2. La forme active p-ERK1/2 augmente d'environ 330% \pm 33% par rapport aux cellules non-exposées à l'agoniste (fig 7B). Par la suite, nous nous sommes intéressés à savoir si cette activation de la protéine ERK1/2 par l'agoniste DPDPE était dépendante des protéines Gi/o. Nous avons refait un immunobuvardage de type Western, mais cette fois, les cellules ont été préalablement exposées à la toxine pertussique 100ng/ml pendant environ 16h, puis le traitement à l'agoniste DPDPE 1 μ M a été réalisé. Nos résultats démontrent que la toxine ne modifie pas l'activité basale de ERK1/2 (fig

7C), mais bloque complètement l'activation de cette voie de signalisation en présence de l'agoniste DPDPE (fig 7D). Ces résultats indiquent alors que l'activation de la cascade ERK par un agoniste DOR dépend des protéines Gi/o.

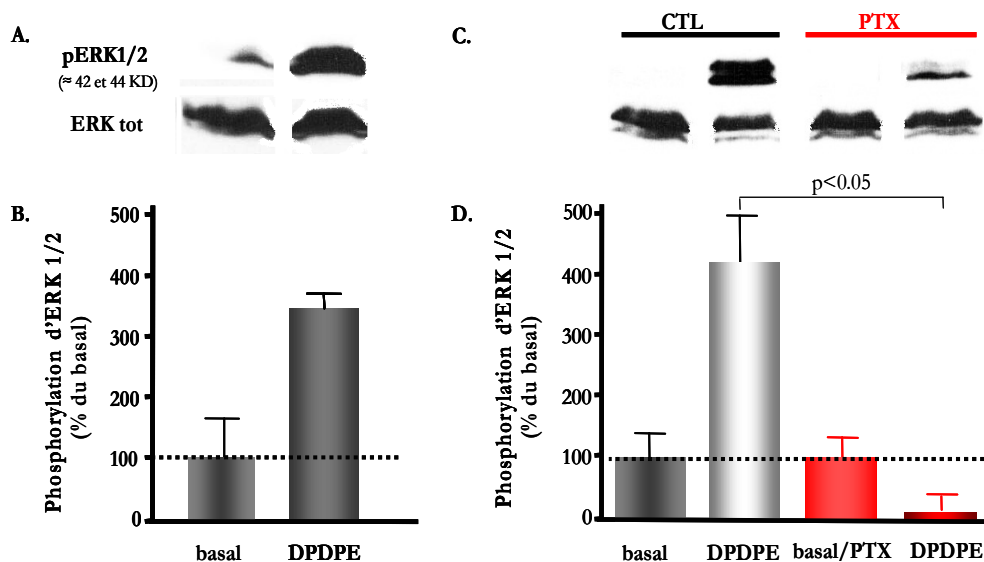


Figure 7. ERK1/2 devient phosphorylée suivant la liaison de l'agoniste DPDPE au DOR. **A,** Des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur de type sauvage FLAG-DOR ont été exposées au DPDPE 1 μ M pendant 5 minutes. Des cellules de la même lignée ont également subi les mêmes traitements sans exposition à l'agoniste. Un immunobuvardage de type Western a permis de vérifier l'activation de ERK1/2. Des bandes spécifiques sont détectées par l'anticorps anti-phospho-ERK1/2 à 42 et 44 KDa ainsi que la forme totale de ERK. **B,** Une mesure semi-quantitative de l'intensité des bandes a été effectuée par densitométrie MCID. La quantité de protéines ERK 1/2 phosphorylées fut normalisée selon la quantité totale de protéine ERK par puits. Les données sont représentatives de 7 expériences indépendantes et correspondent au ratio pERK/ERKtot normalisé par rapport à la moyenne du ratio du basal qui est $0,47 \pm 0,34$. **C,** Le PTX (100ng/ml pendant 16h) diminue la phosphorylation de ERK 1/2 suivant la liaison de l'agoniste DPDPE (+) 1 μ M pendant 5 minutes. Pendant l'exposition au PTX ou non, les cellules ont été privées de milieu contenant des facteurs de croissance puis la stimulation des DOR a été réalisée tel que décrit précédemment. **D,** Les bandes ont été quantifiées et exprimées de la même façon qu'en B. Pour cette série expérimentale, la moyenne du ratio pERK/ERKtot dans la condition basale et basale avec PTX est de $0,7 \pm 0,3$. Le test *t* de Student a été utilisé pour démontrer une différence significative entre l'activation de ERK1/2 par DPDPE dans la condition contrôle et dans la condition avec pré-traitement de PTX.

3.1.2. La phosphorylation de ERK suivant la liaison d'un agoniste est indépendante de la transactivation des RTK

Certains RCPG nécessitent la transactivation de RTK, tel que EGFR, pour activer la voie ERK¹⁴¹⁻¹⁴⁶. Les résultats sont contradictoires quant à la nécessité de la transactivation d'un récepteur à EGF ou non afin de stimuler la protéine ERK pour les DOR. En effet, le groupe de Schulz¹⁰⁴ a démontré qu'en bloquant la transactivation des EGFR par une forte concentration d'un inhibiteur (15µg/ml de tyrphostin), soit une concentration devenue non-sélective, l'activité de la kinase ERK se trouvait modifiée. Nous avons, à notre tour, étudié l'implication de 2 types de RTKs (EGFR et PDGFR) dans la stimulation de ERK par DOR. Pour se faire, un immunobuvardage a été produit à l'aide de cellules HEK293 exprimant de façon stable DOR de type sauvage. Ces cellules ont été privées durant 16h de sérum contenant des facteurs de croissance, puis elles ont été pré-traitées durant 30 minutes à des concentrations spécifiques de bloqueurs des RTK, soit l'AG1478 (100nm) pour les récepteurs à EGF et l'AG1295 (100nm) pour les récepteurs à PDGF, et enfin, les cellules ont été exposées à des concentrations saturantes de DPDPE pendant 5 minutes (Fig 8). Les anticorps détectant les différentes formes de ERK ont été utilisés pour déterminer le ratio «pERK1/2 / ERK1/2 total» afin de normaliser les données selon la quantité de protéines par conditions. Selon ces résultats, le bloqueur AG1478 des EGFR ne modifie pas la phosphorylation de ERK suivant la liaison de l'agoniste DPDPE aux DOR (fig 8A-B). Cependant, lorsque les cellules sont incubées en présence de l'agoniste EGF des EGFR, le bloqueur spécifique AG1478 bloque la phosphorylation de ERK (fig 8A-B). Ces résultats suggèrent donc que l'activation de la cascade ERK par l'agoniste DPDPE des DOR ne nécessite pas la transactivation des EGFR. Le bloqueur AG1295 des PDGFR ne modifie pas la

phosphorylation de ERK1/2 en présence de l'agoniste DPDPE des DOR (fig 8C-D). En fait, l'addition d'un ligand spécifique des PDGFR, le PDGFA/B, n'augmente pas significativement la quantité de pERK (fig 8C-D) par rapport au basal (fig 7A-B). Ces résultats indiquent alors l'absence de PDGFR dans ce type de lignée cellulaire et donc, de l'incapacité du DOR d'activer ERK via un mécanisme impliquant les récepteurs PDGF. Dans ces circonstances, nous n'avons pas jugé nécessaire de refaire l'expérience en ajoutant le bloqueur AG1295. Bref, l'agoniste DPDPE, en se liant aux DOR, augmente la phosphorylation de ERK1/2 indépendamment d'EGFR et de PDGFR pour les cellules HEK293 utilisées dans le cadre de cette étude.

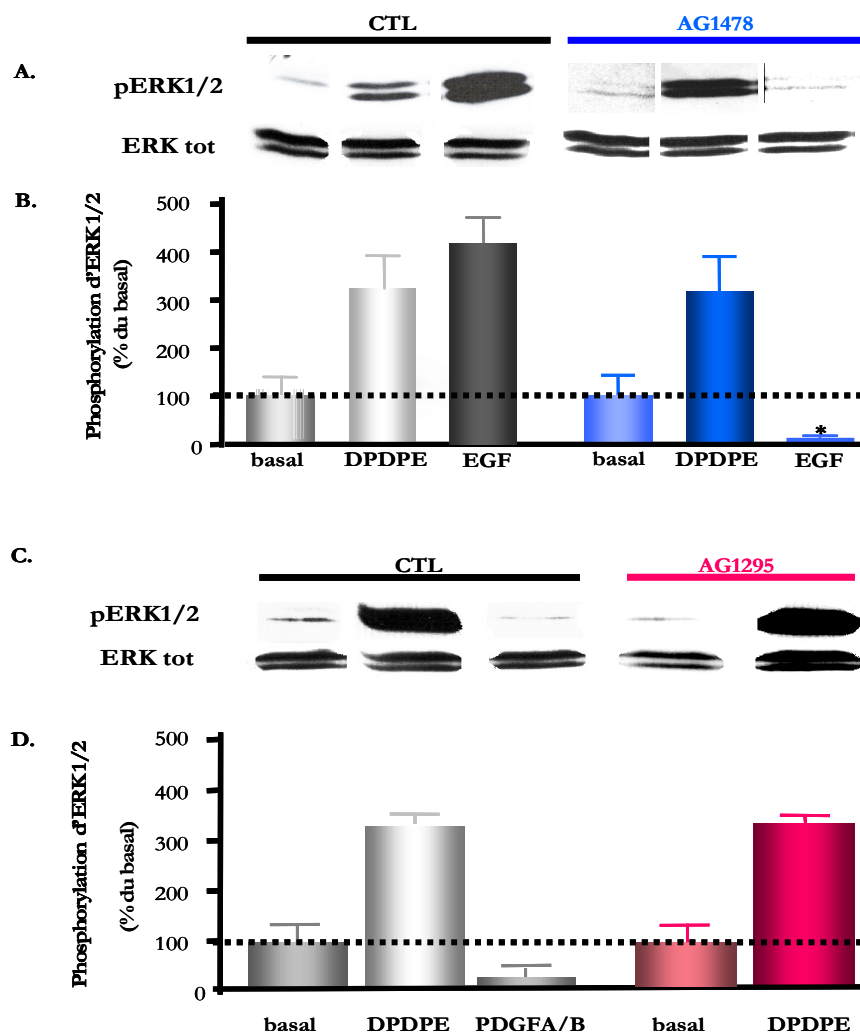


Figure 8. L'activation de ERK par les agonistes DOR ne nécessite pas la transactivation de récepteurs à tyrosine kinase (RTK). **A.** Des cellules HEK293 exprimant de façon stable le FLAG-DOR de type sauvage ont été exposées ou non 30min au bloqueur AG1478 avant leur exposition aux agonistes indiqués (+) 5min. Des cellules de la même lignée ont aussi subi les mêmes traitements sans exposition d'agoniste (-). Un immunobuvardage de type Western montre la présence de bandes spécifiques pERK1/2 détectées par un anticorps anti-p-ERK1/2 ainsi que la forme totale. **B.** Une mesure semi-quantitative de l'intensité des bandes a été effectuée par densitométrie MCID. La quantité de ERK 1/2 phosphorylée a été normalisée selon la quantité totale de protéine ERK par puits. Les données sont exprimées de la façon explicite à la figure 7. Une analyse via le test *t* de Student indique que l'AG1478 n'a pas d'effet significatif ($p = 0.9345$) sur l'activation de ERK par DOR lorsque ce dernier est stimulé par le DPDPE. Cependant, une diminution significative * ($p = 0.0002$) de l'activité de ERK est notée via ce même test lorsque les cellules sont exposées à l'agoniste EGF en présence de l'inhibiteur AG1478. Les données sont représentatives de 4 expériences indépendantes et la moyenne du ratio de phosphorylation du basal est de $0,76 \pm 0,26$ et celui du basal avec AG1478 est de $0,74 \pm 0,40$. **C.** Répétition de l'expérience effectuée en A. Cette fois, les cellules sont exposées ou non au bloqueur AG1295 des PDGFR. **D.** Il s'agit d'une mesure semi-quantitative des bandes obtenues en C par densitométrie MCID. Le test *t* de Student ne révèle aucune différence significative ($p = 0.8247$) en présence/absence d'AG1295 lorsque les cellules sont traitées avec l'agoniste DPDPE. Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes et la moyenne du ratio de phosphorylation du basal est de $0,60 \pm 0,15$ et celui du basal avec AG1295 est de $0,61 \pm 0,13$.

3.1.3. L'activation de ERK est indépendante du phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)

Tel qu'introduit précédemment, l'activation de la cascade ERK peut être dépendante de la PI3K, elle-même activée via le dimère $\beta\gamma$ des protéines Gi/o¹⁴⁷⁻¹⁵⁰. Nous avons alors voulu vérifier ce fait avec les récepteurs DOR. Les expériences d'immunobuvardage se sont déroulées de la même manière que les précédentes. Dans ce cas-ci, le prétraitement consistait à exposer les cellules 30 minutes à la wortmannine 1 μ M, un inhibiteur spécifique des PI3K. L'agoniste DPDPE a été utilisé dans les mêmes conditions que les expériences précédentes, soit 1 μ M pendant 5 minutes. En présence de wortmannine, il y a une légère augmentation non-significative de la phosphorylation de ERK (fig 9A-B) en réponse à DPDPE. De ce fait, l'inhibition des PI3K n'affecte pas l'activité de la cascade ERK lorsque le récepteur DOR est stimulé par l'agoniste DPDPE. En d'autres termes, le récepteur, une fois activé, stimule la kinase ERK indépendamment de la PI3K. Afin de vérifier l'efficacité de la wortmannine, des cellules HEK293 exprimant le récepteur β 3-adrenergique ont été exposées à un agoniste, l'isoprotérénol (5 minutes à 1 μ M), puisque ces récepteurs sont connus pour stimuler ERK via la voie PI3K¹⁵¹. Tel que déjà rapporté dans la littérature¹⁵², l'inhibition de la PI3K par 100nM de wortmannine réduit l'activation de ERK d'environ 70% lorsque les récepteurs β - adrénergiques sont stimulés par de l'isoprotérénol (n=2).

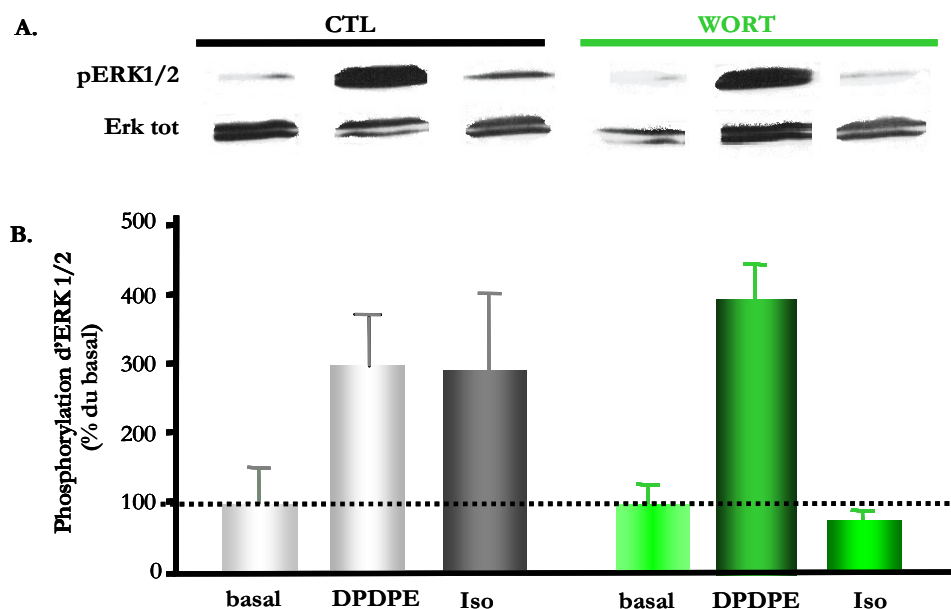


Figure 9. L'activation de ERK par les agonistes de DOR ne nécessite pas la PI3K. **A.** Des cellules HEK293 exprimant de façon stable FLAG-DOR de type sauvage ou le récepteur β 3-adrenergique ont été exposées ou non 30min à l'inhibiteur wortmannine 100 nM avant leur exposition aux agonistes indiqués pendant 5min. Des cellules de la même lignée ont aussi subi les mêmes traitements sans exposition d'agoniste. Un immunobuvardage de type Western montre la présence de bandes spécifiques pERK détectées par un anticorps anti-p-ERK 1/2 ainsi que la forme total de ERK. **B.** Une mesure semi-quantitative des bandes a été obtenue par densitométrie MCID. La quantité de ERK 1/2 fut normalisée selon la quantité totale de protéines par puits. Les données sont exprimées telles que décrites dans la figure 7. Les données sont représentatives de 5 expériences indépendantes pour le récepteur DOR et de 2 expériences pour le récepteur β 3-adrenergique. La moyenne du ratio de phosphorylation du basal est de $0,90 \pm 0,50$ et celui du basal avec wortmannine est de $0,74 \pm 0,22$. Le test *t* de Student n'a révélé aucune différence significative ($p = 0.1973$) en ce qui à trait aux cellules exprimant le récepteur DOR en présence/absence de wortmannine avec l'agoniste DPDPE.

3.2. Étude de l'activation de Src par les DOR

Comme il a été précédemment mentionné, la tyrosine kinase Src interviendrait dans certaines étapes de la régulation des RCPG ainsi que dans l'activation de la cascade ERK par ces mêmes récepteurs^{153,154}. Nous avons donc effectué 2 expériences afin de déterminer si la stimulation des DOR est reliée à celle de la tyrosine kinase Src.

3.2.1. La stimulation des DOR par un agoniste active Src

Nous avons voulu voir, dans un premier temps, si l'activation du DOR par l'agoniste DPDPE entraînait la phosphorylation de la protéine Src. Les cellules HEK293 exprimant de façon stable DOR de type sauvage ont été exposées pendant 16h au sérum exempt de facteurs de croissance avant l'ajout de DPDPE (1 μ M) pendant 5 minutes. Ensuite, un immunobuvardage de type Western a été effectué à l'aide d'anticorps dirigés contre la forme active de Src (i.e. forme phosphorylée au niveau du résidu Tyr 416) ainsi que contre toute forme reconnue de la protéine Src (i.e. anticorps ne discriminant pas les formes actives des inactives). Nos résultats indiquent que la phosphorylation de la tyrosine kinase Src augmente significativement lorsque le DOR est stimulé par l'agoniste DPDPE (fig 10A-B).

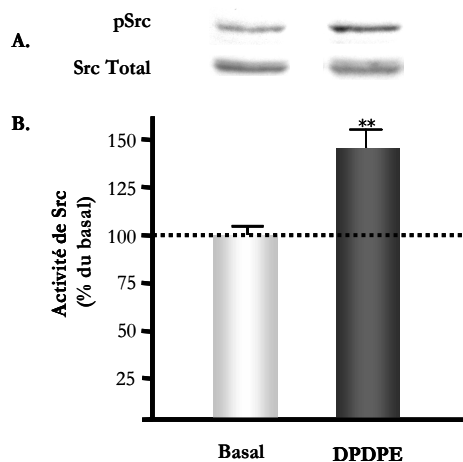


Figure 10. L'activation de DOR par un agoniste augmente la phosphorylation de Src. **A,** Des cellules HEK293 exprimant de façon stable FLAG-DOR de type sauvage ont été exposées au DPDPE 1 μ M pendant 5 minutes. Des cellules de la même lignée ont également subi les mêmes traitements sans exposition d'agoniste. Un immunobuvardage de type Western où nous avons utilisé des anticorps dirigés contre la forme active phosphorylée (anti-pTyr416) nous montre la présence de la protéine Src (poids moléculaire de 60 KDa) ainsi que la forme totale. **B,** Une mesure semi-quantitative des bandes a été effectuée par densitométrie MCID. La quantité de protéine Src fut normalisée selon la quantité de protéines reconnues par l'anticorps anti-Src total dans chaque puits. Les données sont exprimées comme le ratio de la densité optique de Src tyr-phosphorylé 416 sur la densité optique de Src total. Les données sont représentatives de 7 expériences indépendantes et correspondent au ratio pSrc/Src total normalisé par rapport à la moyenne du ratio de phosphorylation du basal qui est $1,0 \pm 0,05$. Le test *t* de Student révèle une différence significative ** ($p=0.0012$) entre le ratio des cellules non-exposées (basal) et exposées (DPDPE) à l'agoniste DPDPE. – Résultats publiés dans *JBC*, 2005¹⁵⁵

3.2.2. L'activation de Src suivant la liaison d'un agoniste DOR est dépendante des protéines G

Dans un deuxième temps, puisque l'activation du DOR stimule Src et que ce récepteur est généralement couplé aux protéines Gi/o, nous avons voulu déterminer si ce processus était dépendant des protéines Gi/o. Un immunobuvardage de type Western a été effectué à l'aide de cellules HEK293 exprimant de façon stable DOR de type sauvage. Ces cellules ont été préalablement exposées 16h à 100 ng/ml de la toxine pertussique (PTX) dans un sérum dépourvu de facteurs de croissance. L'agoniste DPDPE (1 μ M) a par la suite été ajouté à ces cellules pendant 5 minutes. Nos résultats démontrent que le traitement à la PTX produit une légère augmentation de l'activité basale de la protéine Src mais qu'il bloque tout de même sa phosphorylation en présence de DPDPE (figure 11), suggérant que l'activation de Src soit dépendante des protéines Gi/o.

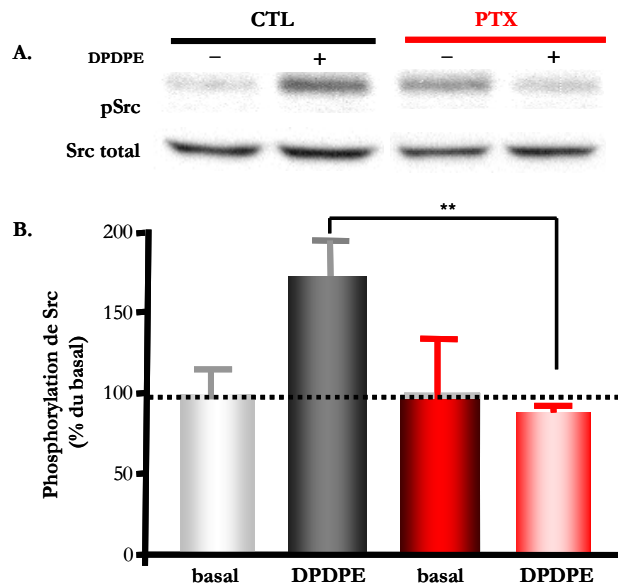


Figure 11. L'activation de Src est dépendante des protéines Gi/o. Des cellules HEK293 exprimant de façon stable FLAG-DOR de type sauvage ont été exposées 16h à 100 ng/ml de la toxine pertussique (PTX). Ces cellules ont ensuite été incubées avec du DPDPE 1 μ M pendant 5 minutes. Des cellules de la même lignée ont également subi les mêmes traitements sans être exposées à l'agoniste et/ou à la toxine. **A**, Un immunobuvardage de type Western nous montre la présence de la protéine Src phosphorylée (anticorps dirigé contre la forme active de Src) et la forme totale. Une mesure semi-quantitative a été effectuée par densitométrie MCID. **B**, Une mesure semi-quantitative a été effectuée par densitométrie MCID. Les données sont exprimées comme le ratio de la densité optique de Src tyr-phosphorylé 416 sur la densité optique de Src total et sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Elles correspondent au ratio pSrc/Src tot normalisé en fonction de la moyenne du ratio du basal qui est de $1,01 \pm 0,13$ et celui du basal avec PTX est de $1,27 \pm 0,52$. Une analyse statistique via le test *t* de Student indique que le PTX n'a pas d'effet significatif ($p > 0,05$) sur la phosphorylation de Src en situation contrôlée. Cependant, une perte significative ** ($p = 0,0012$) de l'effet de DPDPE sur la stimulation de Src survient suite à l'ajout de PTX.

3.3. Étude de l'implication de Src dans l'activation de la voie ERK

3.3.1. L'inhibition de Src produit un effet biphasique sur l'activité de la protéine ERK suivant l'activation de DOR par DPDPE

Le but de la prochaine série d'expériences était de vérifier si la tyrosine kinase Src était impliquée dans l'activation de la cascade ERK. Après avoir démontré que la liaison du DPDPE au DOR activait la protéine ERK et la kinase Src, nous avons examiné l'effet de l'inhibiteur spécifique PP2 sur l'activation de ERK. PP2 réprime spécifiquement l'activité tyrosines kinases des protéines appartenant à la famille de

Src. Un immunobuvardage de type Western a été fait à l'aide de cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur DOR. La veille de l'expérience, ces cellules ont été incubées dans un milieu sans facteur de croissance. Le jour même, elles ont été exposées 1h à des concentrations croissantes de PP2 (20, 40 ou 80 μ M) ou d'un véhicule (pour la situation contrôle), puis mises en présence de l'agoniste DPDPE 5 minutes (1 μ M). Les anticorps reconnaissant anti-p-ERK et toute forme de ERK1/2 ont été utilisés. Selon nos résultats, nous notons un effet biphasique de l'inhibiteur PP2 sur l'activation de la kinase ERK par les DOR. En effet, les faibles concentrations de PP2 (20 μ M et 40 μ M) augmentent l'activation de la protéine ERK suivant la liaison du DPDPE aux DOR alors que la plus forte concentration (80 μ M) inhibe l'activation de cette même MAPK (fig 12A-B). Cependant, nos observations ne démontrent ce fait qu'à une forte concentration non-spécifique de PP2. Ces résultats nous ont amenés à produire un autre mode d'inhibition de Src puisque nous ne pouvions exclure que l'inhibition observée aux fortes doses de PP2 était due à un phénomène non spécifique (i.e. inhibition de l'ensemble des tyrosines kinases n'appartenant pas à la famille de Src). Ainsi, dans le but d'arriver à une conclusion recevable, une expérience alternative garante de la sélectivité du blocage de Src a été créée ; il s'agissait d'utiliser un mutant inactif (non phosphorylable) de Src (i.e. Src K296R/Y528F). Afin de déterminer si nous pouvions recréer l'effet biphasique observé en présence de l'inhibiteur pharmacologique de Src (PP2), des cellules ont été transfectées transitoirement avec de l'ADN du récepteur FLAG-DOR ainsi qu'avec des concentrations croissantes d'ADN d'un mutant inactif de Src (K296R/Y528F). Cette expérience a généré des résultats biphasiques similaires à ceux obtenus avec l'inhibiteur pharmacologique PP2 (fig 13A-B). En fait, une faible concentration de mutant (0.5 μ g d'ADN) augmente la phosphorylation de ERK alors

qu'une forte concentration de ce même mutant (3 μ g d'ADN) inhibe la phosphorylation de ERK en présence de DPDPE (1 μ M). Si le seul effet de Src était son implication dans l'activation de ERK, il serait envisageable de croire que des concentrations croissantes d'inhibiteur PP2 et/ou encore du mutant inactif puissent induire une inhibition progressive de la protéine ERK activée par le récepteur. Cependant, l'inhibition n'est observée qu'à une forte concentration d'ADN de la forme inactive de la tyrosine kinase ainsi qu'à une forte concentration de l'inhibiteur pharmacologique PP2. Ceci nous amène donc à croire que Src soit nécessaire à l'activation de la voie ERK par l'agoniste DPDPE. Ces dernières données obtenues concordent avec celles publiées par Kramer et collègues ¹²³ qui démontraient qu'une inhibition pharmacologique de Src par PP1 50 μ M interférait avec l'activation de ERK suivant la liaison d'un agoniste au récepteur. Cependant, le fait que de faibles concentrations de l'inhibiteur PP2 et du mutant inactif de Src augmentent l'activité de ERK par le DPDPE nous suggère que la protéine Src pourrait aussi être impliquée dans une régulation négative de l'efficacité des agonistes DOR à stimuler la cascade ERK.

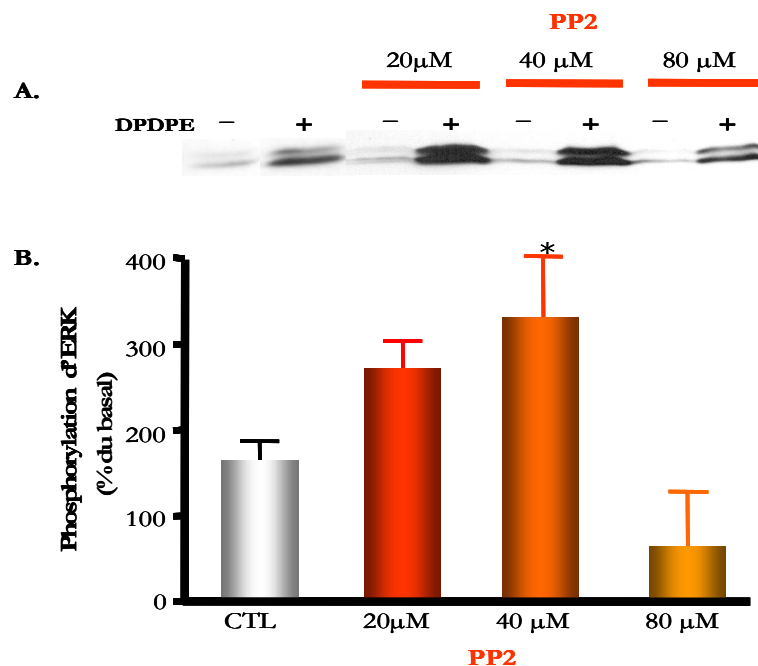


Figure 12. L'inhibiteur pharmacologique de Src, PP2, produit un effet biphasique sur l'activation de ERK par DOR. A, Des cellules HEK293 exprimant de façon stable FLAG-DOR de type sauvage ont été soumises à différentes concentrations de PP2 ou au véhicule (Me₂SO, 0.01%) pendant 1h avant l'ajout de DPDPE 1 μM pendant 5 minutes. Un immunobuvardage de type Western nous montre la présence de la protéine ERK1/2 phosphorylée à l'aide d'anticorps dirigés contre la forme active. B, Les données ont été calculées de la façon décrite précédemment. Le test statistique à une variable ANOVA suivi du test post hoc de Dunnett montre une différence significative * ($p < 0.05$) entre les cellules pré-traitées à 40 μM PP2 et le contrôle (CTL). Les données sont représentatives de 4 expériences indépendantes. – Résultats publiés dans *JBC*, 2005¹⁵⁵

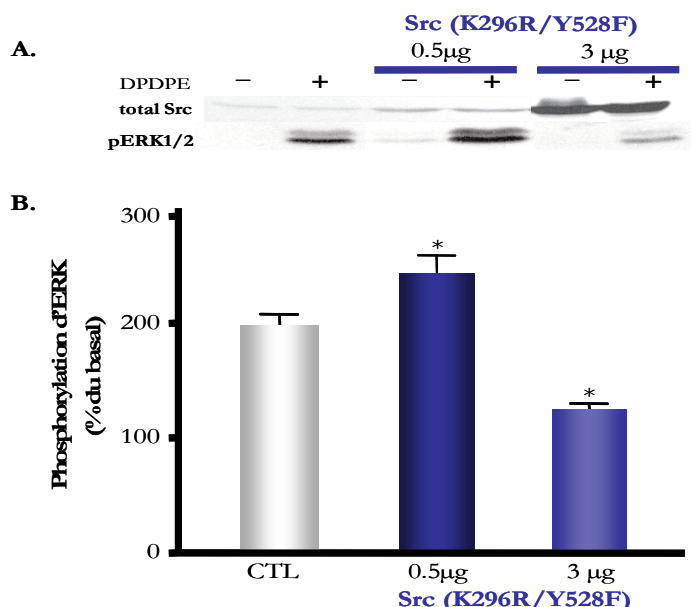


Figure 13. Le mutant inactif de Src (K296R/Y528F) produit un effet biphasique sur l'activation de ERK par DOR. **A,** Des cellules HEK293 ont été transitoirement transfectées avec de l'ADN FLAG-DOR ainsi qu'avec des quantités croissantes d'ADN codant pour un mutant inactif de Src (K296R/Y528F). Les bandes obtenues à l'immunobuvardage de type Western correspondent à la forme totale de Src dans le but de démontrer l'expression croissante de cette protéine avec les quantités croissantes d'ADN transfecté (bandes supérieures). Les bandes inférieures démontrent la présence de la protéine ERK1/2 phosphorylée. **B,** Les résultats ont été exprimés via la méthode décrite antérieurement. Le test statistique à une variable ANOVA suivi du test post hoc de Dunnett montre une différence significative * ($p < 0.05$) entre les cellules CTL et celles transfectées avec les différentes concentrations d'ADN du mutant inactif. Les données sont représentatives de 4 expériences indépendantes. – Résultats publiés dans *JBC*, 2005¹⁵⁵

3.3.2. L'inhibition pharmacologique de Src prolonge l'activité de la cascade ERK

Puisque l'augmentation de la phosphorylation de la protéine ERK 1/2 par l'inhibition de Src à faible concentration n'avait pas encore été décrite, notre prochain objectif a été de caractériser ce phénomène. Pour ce faire, nous avons comparé la cinétique de l'activation de la protéine ERK à différents temps d'incubation avec DPDPE en présence et absence de l'inhibiteur PP2. D'abord, la figure 14 illustre l'activation de ERK à différents temps d'incubation avec DPDPE 1µM sur les cellules HEK293 exprimant de façon stable FLAG-DOR de type sauvage. Avec le temps, il y a une diminution de la quantité de p-ERK 1/2. En fait,

l'activité maximale se retrouve à 5 minutes alors qu'après 30 minutes d'incubation avec l'agoniste DPDPE, l'activité p-ERK est complètement disparue (figure 14).

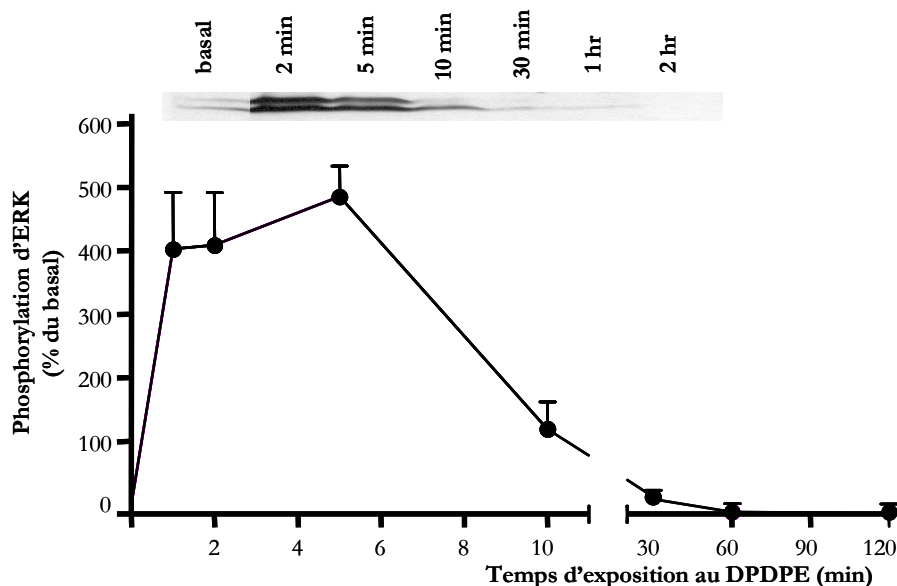


Figure 14. Cinétique d'activation de la cascade ERK suivant la liaison de l'agoniste DPDPE au δ OR. Des cellules HEK293 exprimant de façon stable FLAG-DOR de type sauvage ont été exposées à des concentrations saturantes de l'agoniste DPDPE (1 μ M) à différents temps d'incubation. Un immunobuvardage de type Western représentant la forme phosphorylée de la protéine ERK 1/2 est illustré selon différents temps d'exposition au DPDPE. Les données sont exprimées tel qu'expliqué précédemment et sont représentatives de 4 expériences indépendantes. – Résultats publiés dans *JBC*, 2005¹⁵⁵

Suite à ces résultats, nous avons décidé de reproduire la même expérience [5, 10, 30, 60 minutes] en présence de 20 μ M de l'inhibiteur PP2 afin de vérifier si l'inhibition de la tyrosine kinase allait modifier la cinétique d'activation de la cascade ERK. Les cellules ont été exposées pendant 1h au PP2 20 μ M puis exposées à l'agoniste DPDPE. À nouveau, on note une absence complète de p-ERK à 30 minutes d'exposition au DPDPE dans la situation contrôle (fig 15). Cependant, à 30 minutes d'exposition au DPDPE en présence de PP2 20 μ M, il reste $18 \pm 5\%$ de la réponse maximale p-ERK. Ce pourcentage correspond à une augmentation d'environ 95% par rapport au basal. De plus, le traitement au PP2 a un effet stabilisateur sur la

phosphorylation de la protéine ERK après 30 minutes d'exposition à l'agoniste, car la valeur de la phosphorylation de la kinase à 1h n'est pas significativement modifiée par rapport à celle notée à 30 minutes (à 1h $16 \pm 5\%$ de la valeur maximale).

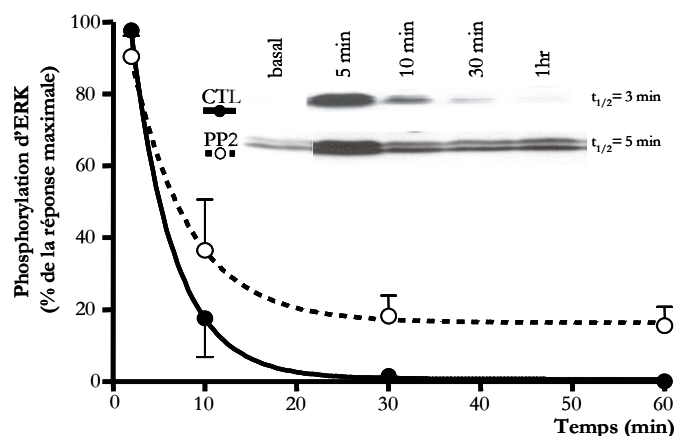


Figure 15. Cinétique d'activation de la cascade ERK en présence et absence de PP2 suivant la liaison de l'agoniste DPDPE au δ OR. Des cellules HEK293 exprimant de façon stable FLAG-DOR de type sauvage ont été pré-traitées en présence de PP2 20 μ M 1h ou du véhicule (Me₂SO₄ 0.01%) avant l'addition de DPDPE 1 μ M aux temps indiqués. Un immunobuvardage de type Western caractéristique de la forme phosphorylée de la protéine ERK 1/2 est illustré. Les données sont exprimées en pourcentage de changement par rapport à la réponse maximale selon la formule décrite antérieurement et elles sont représentatives de 4 expériences indépendantes. Les courbes sont ajustées au mode exponentiel décroissant à l'aide du logiciel GraphPad Prism 2.01 et analysées par ANOVA à 2 variables. Le $T_{1/2}$ apparaît à droite des immunobuvardages de type Western. Une différence significative n'est notée qu'après 30 minutes de stimulation à l'agoniste DPDPE en présence de PP2 ($p < 0.01$) par rapport à la situation contrôle. – Résultats publiés dans *JBC*, 2005¹⁵⁵

3.4. Étude de l'implication de Src dans la désensibilisation des récepteurs DOR

3.4.1. L'inhibition de Src protège contre la désensibilisation par DPDPE dans un essai d'accumulation d'AMPc

Nos observations démontrant que l'inhibition de Src prolonge la réponse de DOR aux agonistes suggèrent que cette kinase aurait un rôle au niveau de la désensibilisation fonctionnelle du récepteur. Pour vérifier cette assertion, nous avons étudié l'effet de l'inhibiteur PP2 sur la désensibilisation de la réponse menant à

l'inhibition d'une cyclase, l'adénylate cyclase, lorsque le DOR est stimulé par un agoniste. Dans un premier temps, nous avons effectué une courbe dose-réponse faisant intervenir la production d'AMPc (préalablement augmentée par de la forskoline (25 μ M)) en fonction de concentrations croissantes de l'agoniste DOR, DPDPE. Les résultats obtenus indiquent une inhibition croissante de la production d'AMPc à mesure que la concentration de DPDPE augmente. L' EC_{50} est de 4 ± 1 nM et l' E_{max} de la réponse au DPDPE est de $61 \pm 2\%$ d'inhibition. Cette expérience a été répétée à l'aide de cellules désensibilisées pendant 30 min à l'agoniste DPDPE 1 μ M. Dans ce cas, l'inhibition de la production d'AMPc aux différentes concentrations d'agoniste (fig16 A) est moins marquée, avec une E_{max} qui n'atteint que $72 \pm 10\%$ de l'effet observé dans des conditions non-désensibilisées et une puissance réduite par un facteur de 8, soit 32 ± 2 nM d' EC_{50} . L'expérience suivante consistait à étudier l'effet de PP2 sur la désensibilisation de la réponse faisant intervenir l'adénylate cyclase et la production d'AMPc. Les cellules ont été pré-traitées pendant 1h au PP2 20 μ M et, 30 minutes avant la fin du prétraitement, l'agoniste DPDPE (1 μ M) a été ajouté afin de reproduire les conditions de désensibilisation précédemment obtenues (fig 16 B). Selon nos résultats, l'exposition des cellules au PP2 avant et pendant la désensibilisation rétablit l'inhibition de la production d'AMPc à un niveau similaire à la condition contrôle en présence de PP2, signifiant que l'activité de Src soit requise pour la désensibilisation de DOR.

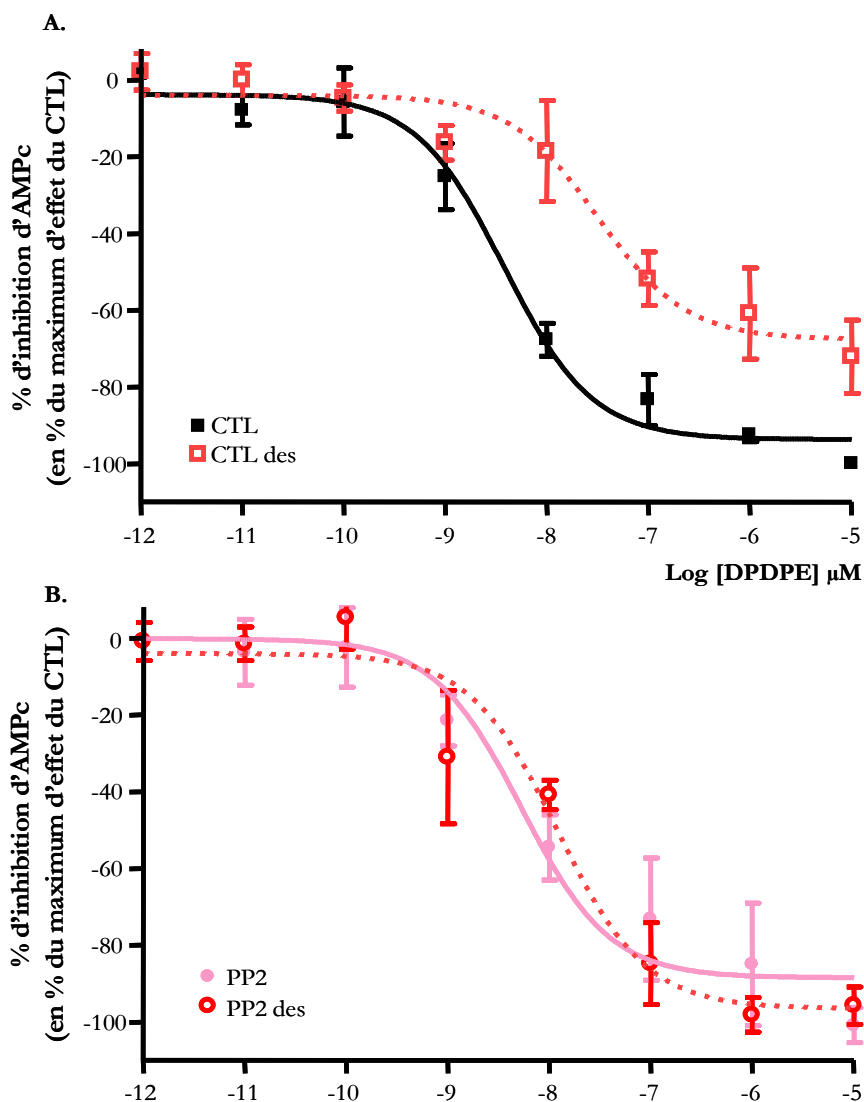


Figure 16. Effet de PP2 sur l'inhibition de la production d'AMPc lors de la désensibilisation du δ OR par DPDPE. **A.** Des cellules HEK293 exprimant de façon stable FLAG-DOR de type sauvage ont été exposées 16h à 1 μ Ci/ml à l'adénine [3 H], puis une courbe dose-réponse a été effectuée avec l'agoniste DPDPE sur ces mêmes cellules désensibilisées ou non 30 minutes avec 1 μ M de DPDPE. Les données sont représentatives de 4 expériences indépendantes effectuées en triplicata et elles sont exprimées en pourcentage de changement de la production d'AMPc par rapport aux valeurs maximales obtenues dans la situation non-désensibilisée. Une analyse ANOVA à 2 variables indique une différence significative entre les courbes ($p < 0.0001$) **B.** Même expérience qu'en A excepté que les cellules ont été exposées à 20 μ M de PP2 pendant 1h le jour même de l'expérience. Une analyse ANOVA à 2 variables indique une différence non-significative entre les 2 courbes ($p = 0.7$). Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes effectuées en triplicata. – Résultats publiés dans *JCMM*, 2008¹⁵⁶

Les prochaines expérimentations visaient à confirmer les observations précédentes. Pour ce faire, un mutant dominant négatif de Src K296R/Y528F ainsi que la forme sauvage du DOR ont été co-transfectés dans des cellules HEK293. Selon les données obtenues, l'inhibition de la production d'AMPc en présence de DPDPE pour les cellules transfectées avec DOR – pcDNA3 (vecteur vide) est comparable à l'inhibition obtenue pour les cellules transfectées avec DOR et le mutant inactif de Src ($p = 0,98$; $n = 5$; fig. 17A). Alors, si on compare la capacité du DPDPE à désensibiliser les DOR en présence/absence du mutant inactif de Src, on constate un effet similaire à celui de l'inhibiteur pharmacologique de Src. En fait, la présence du mutant inactif de Src est capable de contrecarrer de façon significative ($p < 0,001$) l'effet désensibilisateur. En résumé, l'inhibition pharmacologique ou moléculaire de Src protège contre la désensibilisation des récepteurs delta en présence d'un agoniste spécifique.

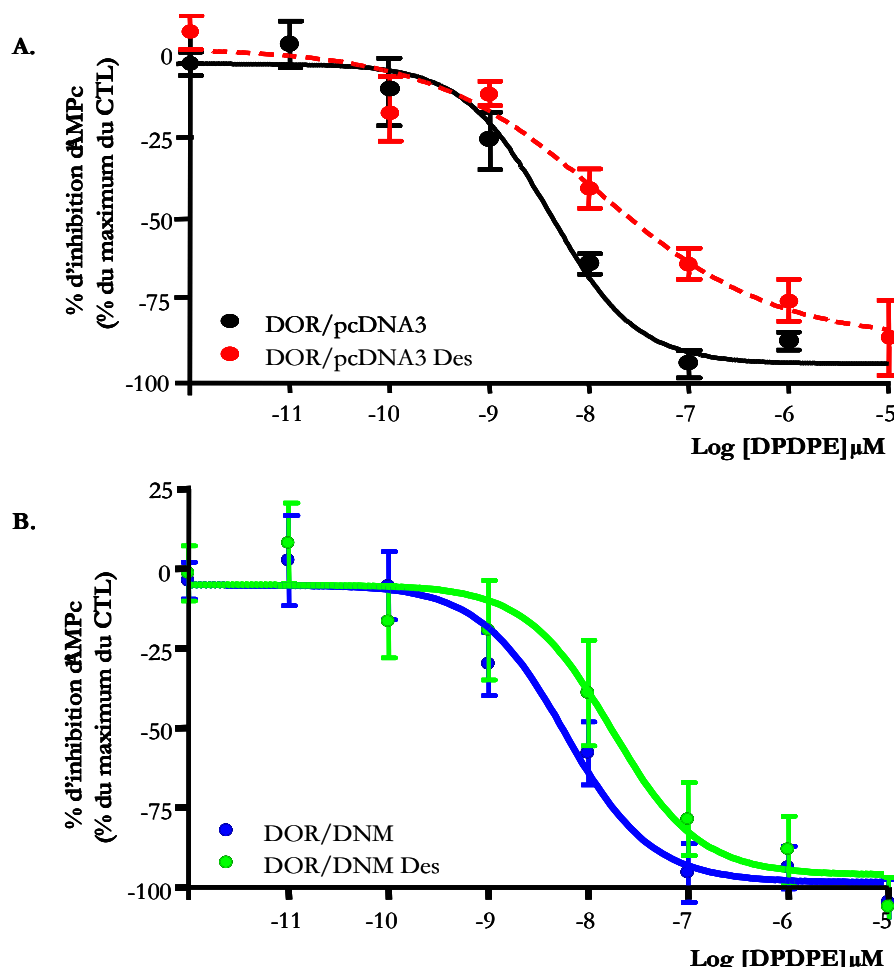


Figure 17. Effet d'un mutant dominant négatif de Src sur l'inhibition de la production d'AMPc lors de la désensibilisation du δOR par DPDPE. Une co-transfection transitoire de DOR avec l'ADN pcDNA3 (A) ou avec l'ADN du mutant inactif de Src (B) a été effectuée. La veille de l'expérience, ces cellules ont été exposées 16h à $1\mu\text{Ci/ml}$ à l'adénine [^3H]. Le jour de l'expérience, les cellules ont été traitées 30 minutes ou non à $1\mu\text{M}$ de DPDPE et au moment de l'expérience, avec diverses concentrations du même ligand. Les données sont exprimées en pourcentage de la valeur maximale obtenue lorsque les cellules ne sont pas désensibilisées. Elles sont représentatives de 5 expériences différentes et une analyse à 2 variables ANOVA montre une différence significative entre la situation contrôle et désensibilisée en ce qui à trait aux cellules exprimant le vecteur pcDNA3 ($p = 0.0002$) mais pas en ce qui concerne les cellules exprimant la forme inactif de Src en situation contrôle ou désensibilisée ($p = 0.7$). – Résultats publiés dans *JCMM*, 2008¹⁵⁶

3.4.2. L'inhibition de Src n'a pas d'effet sur le processus d'internalisation des DOR

Suite à une stimulation prolongée des récepteurs par un agoniste, les mécanismes de désensibilisation et d'internalisation des récepteurs s'enclenchent^{2,157,158}. De ce fait, il a déjà été démontré que Src phosphorylait les récepteurs delta¹²³⁻¹⁵⁵ et que la mutation de la tyrosine 318 (Y318F) de ces récepteurs interférait avec l'internalisation^{123,124}. Nous nous sommes donc intéressés à déterminer si la régulation de la désensibilisation des DOR dépendait de l'internalisation modulée par Src. Pour ce faire, nous avons produit des essais ELISA afin de calculer le nombre de récepteurs DOR à la surface de la cellule à l'aide d'anticorps ciblant l'épitope Flag présent à l'extrémité N-terminale du récepteur. Ces essais ELISA ont été effectués, dans un premier temps,⁶⁰ en présence ou en absence de PP2 à différents temps d'exposition au DPDPE 1 μ M.

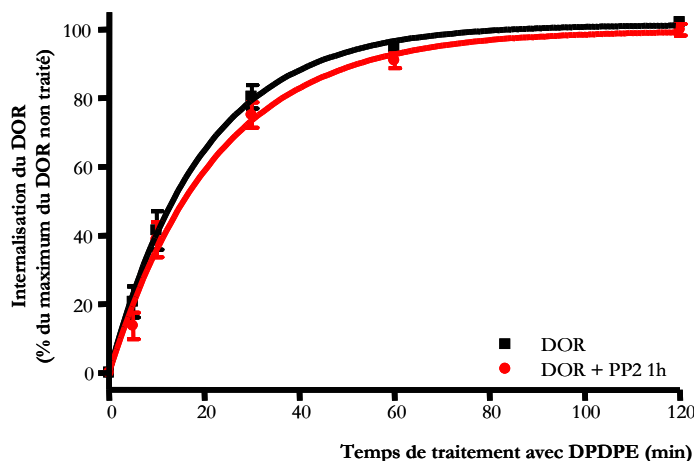


Figure 18. Comparaison de la cinétique d'internalisation des DOR en présence et en absence de PP2. Des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur de type sauvage DOR marqué à l'épitope Flag en N-terminal ont été pré-traitées 1h au PP2 (20 μ M) ou à son véhicule (Me₂SO₄ 0.01%). Par la suite les cellules ont été exposées aux temps indiqués au DPDPE 1 μ M. Les données ont été normalisées par rapport au maximum d'internalisation observé en absence de PP2 et sont exprimées comme la moyenne \pm la moyenne de l'écart-type. Les données sont représentatives de 4 expériences effectuées en triplicata. Une analyse ANOVA à 2 variables nous montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les 2 groupes de données. – Résultats publiés dans *JCMM*, 2008¹⁵⁶

Nos données démontrent que dans les conditions qui protègent contre la désensibilisation (20 μ M; 1 h), le PP2 n'a aucun impact sur l'internalisation du récepteur. Ces résultats sont visibles à la figure 18 où l'internalisation de DOR en présence de l'inhibiteur de Src est similaire à celle observée dans la situation contrôle. En fait, le nombre maximum de récepteurs internalisés suivant la liaison du DPDPE est de $87\% \pm 3\%$ à l'intérieur d'un laps de temps de 2 heures alors que la $T_{1/2}$ d'internalisation est de 14 minutes.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué des tests ELISA sur des cellules qui co-exprimaient transitoirement le mutant dominant négatif de Src et DOR (figure 19), soit le même type de cellules qu'utilisé lors des expérimentations portant sur la désensibilisation fonctionnelle en présence de Src K296R/Y528F. Nous remarquons que le mutant inactif de Src n'a aucun effet sur l'internalisation des récepteurs DOR. Bref, l'inhibition pharmacologique ou moléculaire de Src, dans des conditions qui permettent de protéger contre la désensibilisation, ne modifie pas le processus d'internalisation des récepteurs DOR.

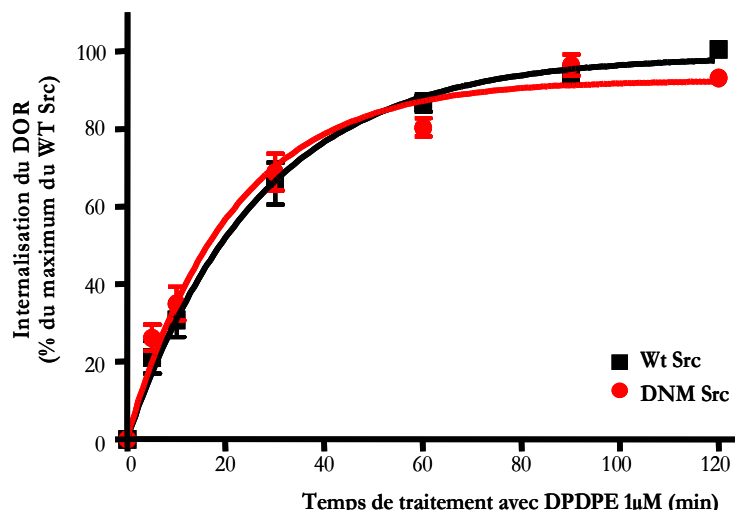


Figure 19. Comparaison de la cinétique d'internalisation des cellules exprimant transitoirement ou non un mutant inactif de Src. Des cellules HEK293 ont été cotransfectées avec le récepteur DOR marqué à l'épitope Flag et avec l'ADN du DNM-SRC ou de pcDNA3. Elles ont été exposées aux temps indiqués à 1 μ M de DPDPE. Des anticorps reconnaissant l'épitope Flag ont été utilisés pour produire les tests ELISA. Les données ont été normalisées par rapport au maximum d'internalisation observé en absence de PP2 et sont exprimées comme la moyenne \pm la moyenne de l'écart-type. Les données sont représentatives de 4 expériences effectuées en triplicate. Une analyse ANOVA à 2 variables a été effectuée et aucune différence significative n'a été notée. – Résultats publiés dans *JCMM*, 2008¹⁵⁶

3.5. Impact de la suppression de la queue C-terminale du DOR sur sa désensibilisation

Les résultats précédents nous indiquent que les inhibiteurs de Src peuvent atténuer la désensibilisation par un agoniste sans toutefois modifier l'endocytose. Ceci nous suggère alors que Src influence l'efficacité de signalisation sans agir sur l'internalisation. Un tel raisonnement nous amène à vérifier la contribution de Src sur la désensibilisation des DOR dans une situation où l'endocytose du récepteur est compromise. Ainsi, nous avons utilisé une forme tronquée du récepteur DOR dont l'internalisation est restreinte en raison de la portion C-terminale manquante ^{121,158}. Nous avons également employé une approche biochimique, soit une solution hypertonique de saccharose 0.4M, pour inhiber l'internalisation du récepteur.

3.5.1. L'internalisation du récepteur tronqué est moins efficace que celle de la forme sauvage, mais l'efficacité de signalisation demeure inchangée.

Nous avons dû préalablement prouver que cette forme tronquée de récepteur internalisait moins que la forme sauvage du même type. Des tests ELISA ont été effectués selon la méthode décrite antérieurement. Tel qu'attendu, il y a une réduction significative du nombre maximum de récepteurs tronqués internalisés en comparaison aux récepteurs sauvages suite à l'exposition à l'agoniste DPDPE 1 μ M (fig. 20).

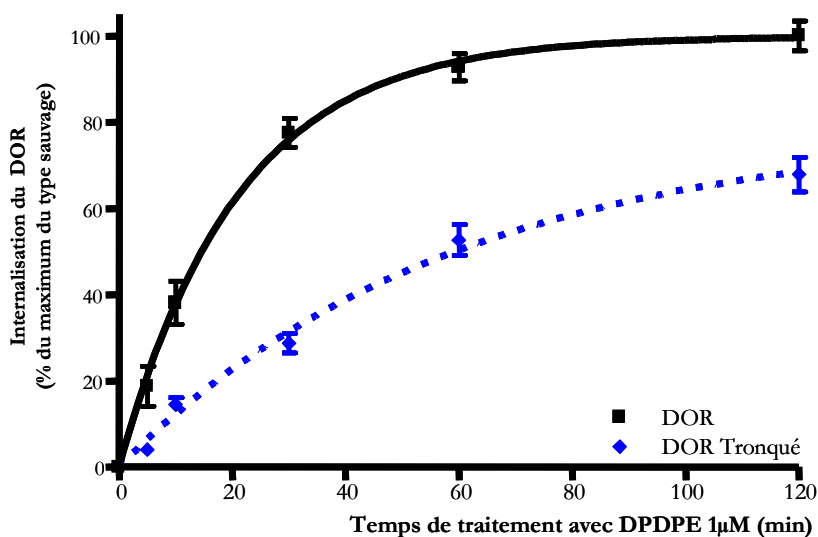


Figure 20. Comparaison de la cinétique d'internalisation des cellules exprimant la forme tronquée ou la forme complète du récepteur DOR. Des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur de type sauvage DOR ou la forme tronquée, tous deux marqués à l'épitope Flag au niveau de l'extrémité N-terminale, ont été incubés avec du DPDPE 1 μ M aux temps indiqués sur la figure. Les données ont été normalisées par rapport au maximum d'internalisation observé avec le récepteur de type sauvage (WT) et sont exprimées comme la moyenne \pm la moyenne de l'écart-type. Les données sont représentatives de 5 expériences effectuées en triplicate. Une analyse ANOVA à 2 variables nous indique une différence significative entre les 2 courbes ($p < 0.0001$). – Résultats publiés dans *JCMM*, 2008¹⁵⁶

Il a déjà été démontré que les propriétés de signalisation du récepteur tronqué DOR ne diffèrent pas de celles observées chez le type sauvage ¹³⁸. Nos essais d'accumulation d'AMPc confirment cette observation à la figure 21.

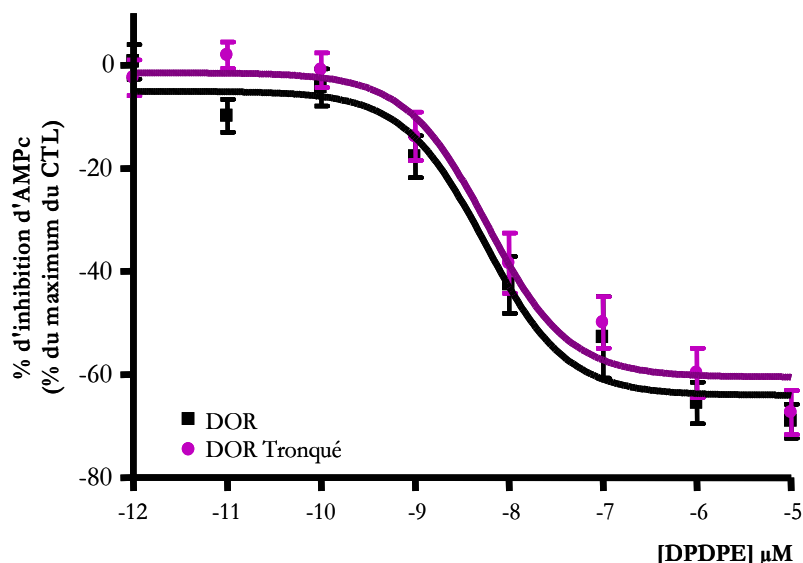


Figure 21. Comparaison de l'effet du DPDPE sur le % d'inhibition de production d'AMPc chez le DOR sauvage et le DOR tronqué. Des cellules HEK293 exprimant de façon stable la même quantité de DOR sauvage ou tronqué ont été exposées 16h à $1\mu\text{Ci/ml}$ à l'adénine [^3H]. Les cellules ont été incubées en présence de forskoline ($25\mu\text{M}$) ainsi qu'avec des concentrations croissantes de DPDPE. Les données sont exprimées en pourcentage de changement par rapport à la production d'AMPc obtenue en présence de forskolin sans DPDPE. Aucune différence significative n'a été notée entre les 2 groupes selon le test ANOVA à 2 variables et les données sont représentatives de 9 expériences indépendantes effectuées en triplicata. – Résultats publiés dans *JCMM*, 2008¹⁵⁶

3.5.2. L'efficacité de l'inhibiteur PP2 à protéger contre la désensibilisation par DPDPE est moindre chez les DOR tronqués que chez les DOR de type sauvage.

Tel que démontré à la figure 22, l'exposition au DPDPE $1\mu\text{M}$ pendant 30 minutes diminue significativement l'efficacité de la signalisation du DOR344T puisque l'habileté subséquente de ce même agoniste à inhiber de façon aiguë l'accumulation d'AMPc est réduite après le pré-traitement. Ces résultats indiquent donc que le récepteur tronqué arrive lui aussi à être désensibilisé. La table 1 démontre que les capacités de signalisation des DOR344T ainsi que leur désensibilisation sont

similaires aux récepteurs DOR WT. De plus, tel que démontré à la figure 22, l'inhibiteur PP2 (20 μ M, 30 min) protège les récepteurs tronqués contre la désensibilisation. Par contre, l'effet protecteur de PP2 sur les récepteurs tronqués ne survient qu'aux fortes concentrations de l'agoniste DPDPE (1 à 10 μ M). Cela nous suggère donc que les inhibiteurs de Src ne modifient pas l'internalisation mais qu'une séquestration optimale est nécessaire pour obtenir un effet protecteur maximal. Finalement, puisque que le récepteur tronqué peut être protégé de la désensibilisation via PP2, nous avons dû démontrer que cet inhibiteur n'avait aucun impact sur l'internalisation du récepteur muté. Dans l'encart supérieur de la figure 22, nous remarquons que les récepteurs tronqués traités pendant 1h à l'inhibiteur de Src, PP2 (20 μ M), sont internalisés au même titre que les récepteurs ayant été exposés au véhicule seulement.

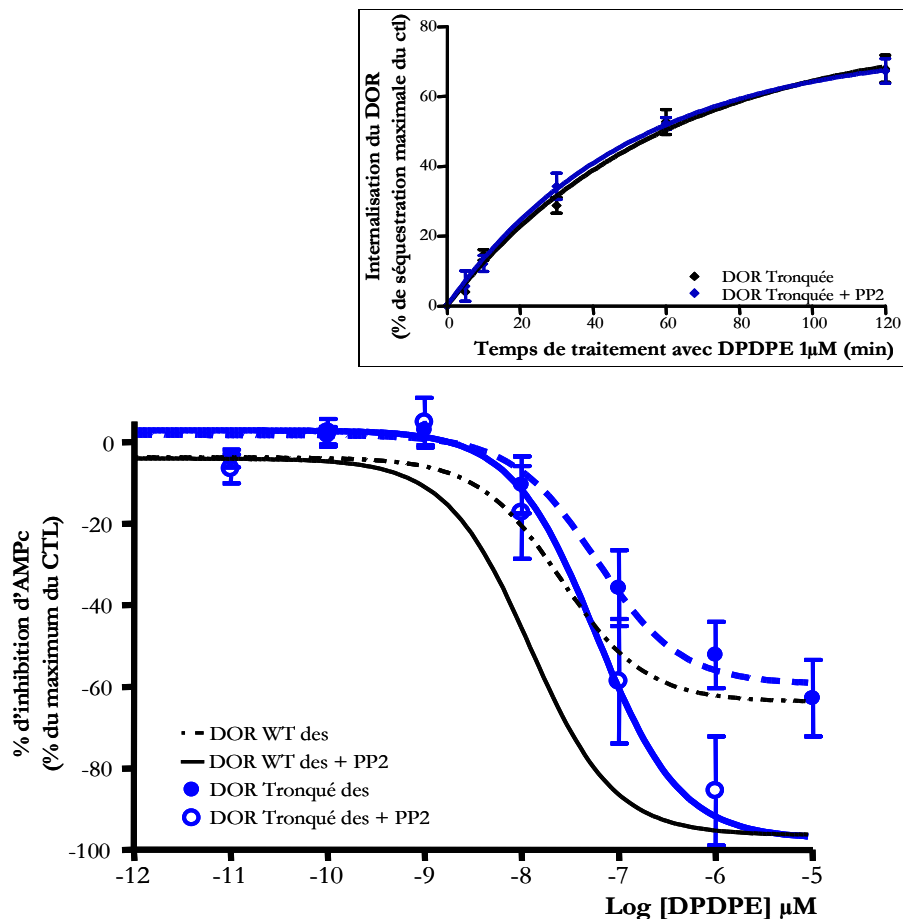


Figure 22. Effet du PP2 sur la cinétique d'inhibition de la production d'AMPc lors de la désensibilisation du δ OR tronqué par DPDPE. Des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur DOR tronqué ont été exposées 16h à 1μCi/ml à l'adénine [3 H] et traitées ou non au PP2 20 μM pendant une heure. Ensuite, les cellules ont été désensibilisées pendant 30 minutes à l'agoniste DPDPE 1μM, puis elles ont été traitées à l'agoniste selon les concentrations indiquées dans la figure. Les données sont exprimées en pourcentage de l'inhibition maximale de la production d'AMPc obtenue avec les DOR WT en situation contrôle (non-désensibilisée). Elles sont représentatives de 4 expériences différentes effectuées en triplicata et une analyse ANOVA à 2 variables indique une différence significative entre les courbes ($p=0.01$). Les trait plus minces expriment la désensibilisation des récepteurs WT avec ou sans PP2 pour fin de comparaison avec les récepteurs tronqués. **Encart supérieur :** Comparaison de la cinétique d'internalisation des DOR tronqués marqués par l'épitope Flag à l'extrémité N-terminale. Ces cellules ont été incubées en présence ou en absence de PP2 (20μM pendant 1h) avant d'être exposées au DPDPE 1μM pendant les temps indiqués sur la figure. Les données ont été normalisées par rapport au maximum d'internalisation observé avec les récepteurs tronqués non-traités et sont exprimées comme la moyenne \pm la moyenne de l'écart-type. Les données sont représentatives de 6 expériences effectuées en triplicata et aucune différence statistique n'est notée suite à une analyse ANOVA à 2 variables. – Résultats publiés dans *JCMM*, 2008¹⁵⁶

Table 1. Signalisation et désensibilisation des récepteurs DOR de type sauvage, tronqués et type sauvage exposé à une solution hypertonique. Des essais d'accumulation d'AMPc en situation contrôle (CTL) et désensibilisée (DES) ont été effectués sur des cellules exprimant de façon stable le récepteur DOR pré-exposé ou non au saccharose (0.4M). Cette même expérience a été effectuée à l'aide de cellules exprimant des quantités similaires de récepteurs tronqués DOR. Les résultats représentent la moyenne plus ou moins l'écart-type de 3 à 9 expériences indépendantes effectuées en triplicata. Pour chacune des conditions, la valeur de E_{\max} représente le % de changement par rapport à la production d'AMPc en situation basale. – Résultats publiés dans *JCMM, 2008*¹⁵⁶

	CTL		DES		Avova 2 variables CTL vs DES
	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (% d'inhibition)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (% d'inhibition)	
Contrôle N = 7	5.5 ± 1.4	64.0 ± 2.8	31.8 ± 1.5	42.5 ± 2.4	p < 0.0001
DOR tronqué N=9	5.9 ± 1.4	60.5 ± 2.7	19.7 ± 2.7	43.0 ± 6.1	p = 0.0045
Saccharose N=3	74.5 ± 3.1*	42.2 ± 7.1*	53.4 ± 1.8	33.2 ± 3.2	p = 0.0250

* différence significative par rapport à la situation contrôle (p = 0,0007)

3.6. Impact du saccharose sur la désensibilisation des récepteurs DOR

Nous avons également vérifié, à l'aide d'une approche biochimique, l'effet de l'inhibition de l'internalisation des DOR sur leur désensibilisation fonctionnelle ainsi que la contribution de Src dans ce mécanisme. Il a déjà été démontré qu'une solution hypertonique contenant 0.4M de saccharose arrivait à inhiber l'internalisation des DOR¹⁵⁹. Ainsi, les expériences effectuées précédemment ont été répétées en présence de saccharose.

3.6.1. Le saccharose bloque l'internalisation du DOR et réduit sa capacité de signalisation.

Contrairement aux situations précédentes où la réponse aiguë au DPDPE était conservée, le saccharose diminue l'efficacité de l'agoniste DPDPE à inhiber la production d'AMPc en plus de bloquer l'internalisation (fig 23 et Table 1). Ces faits sont démontrés par une réduction de 60% de la capacité d'internalisation du récepteur (Fig. 23) ainsi que par une diminution significative de la puissance ($74.5 \pm$

3.1 nM) et de l'efficacité ($42.2 \pm 7.1 \%$) des récepteurs lorsque l'effet de DPDPE est évalué à l'aide de cellules exposées au saccharose 0.4M pendant 4h (voir table 1).

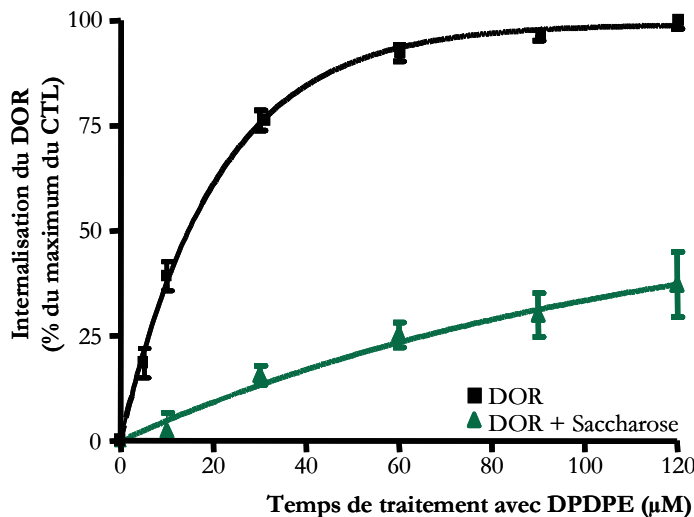


Figure 23. Comparaison de la cinétique d'internalisation du récepteur DOR en présence et en absence de saccharose. Des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur de type sauvage δ OR marquées à l'épitope Flag à l'extrémité N-terminale ont été exposées ou non à une solution de saccharose (0.4M pendant 4h) puis mises en présence de DPDPE 1 μ M pendant les temps indiqués. Les données ont été normalisées par rapport au maximum d'internalisation observé avec le récepteur de type sauvage (WT) en absence de saccharose et sont exprimées comme la moyenne \pm la moyenne de l'écart-type. Une analyse anova à 2 variables montre une différence significative entre les données ($p = 0.0323$) pour un nombre de 3 expériences indépendantes effectuées en triplicata. – Résultats publiés dans *JCMM*, 2008¹⁵⁶

3.6.2. La capacité de PP2 à protéger contre la désensibilisation est presque abolie en présence de saccharose

Nous savons qu'un prétraitement au DPDPE pendant 30 minutes sur des cellules exprimant la forme sauvage de DOR réduit la production d'AMPc par rapport à des cellules non désensibilisées. Ainsi, afin de supporter l'hypothèse selon laquelle l'internalisation optimale des récepteurs est nécessaire afin que PP2 exerce son effet protecteur sur la désensibilisation, nous avons vérifié l'effet de Src sur la désensibilisation des DOR en présence de saccharose. Les résultats obtenus montrent à nouveau une réduction de la capacité de PP2 à protéger contre la désensibilisation et cette réduction est plus marquée que chez les récepteurs

tronqués. Pourtant, malgré la magnitude réduite de l'effet protecteur de PP2, ce dernier continue à réduire de façon significative l'impact du pré-traitement au DPDPE (1 μ M; 30 min) sur la production d'AMPc (ANOVA à 2 variables $p = 0.025$; fig 24). En résumé, l'ensemble de ces résultats indique que l'effet protecteur de PP2 contre la désensibilisation est maximal lorsque l'internalisation est optimisée, ce qui suggère que l'action de Src survient après l'endocytose.

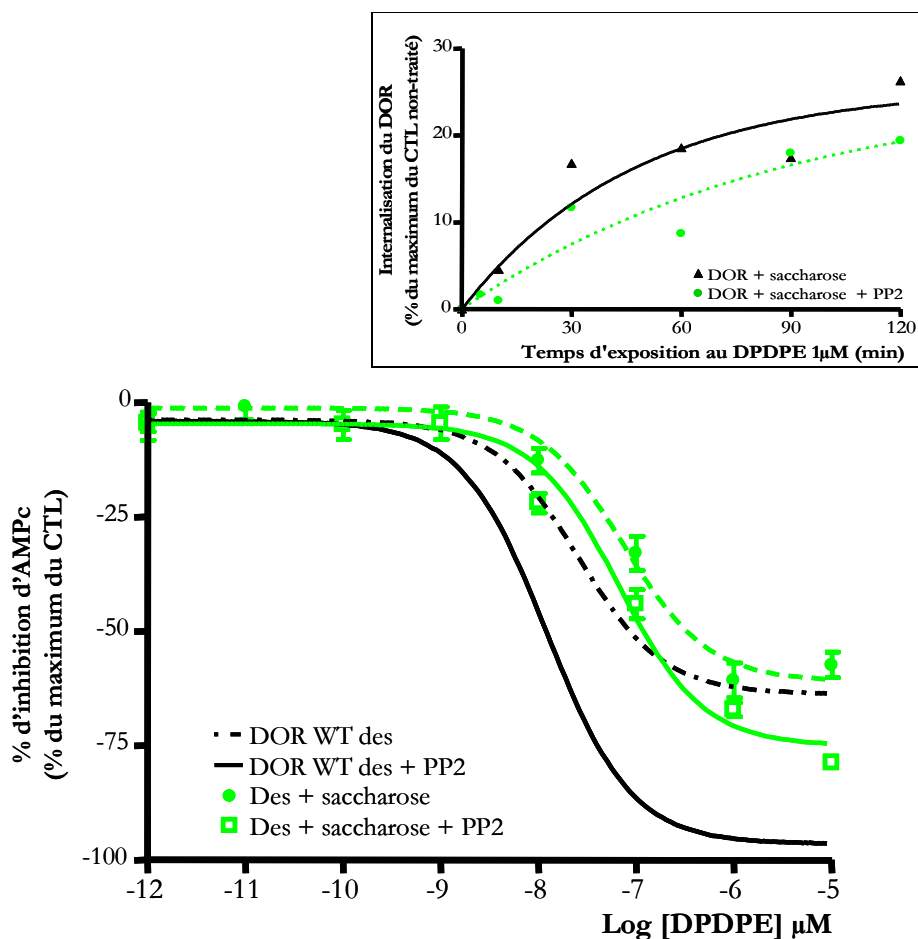


Figure 24. Effet du saccharose sur la désensibilisation du δOR de type sauvage. Des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur δOR de type sauvage ont été exposées 16h à $1\mu\text{Ci/ml}$ d'adénine $[\text{H}]$ et le jour de l'expérience, exposées à une solution de saccharose (0.4M) pendant 4 h. Lors de la dernière heure, du PP2 ($20\mu\text{M}$) a été ajouté ou non aux cellules alors que le ligand DPDPE $1\mu\text{M}$ a été ajouté 30min avant la fin de l'incubation pour désensibiliser les cellules. L'expérience d'accumulation d'AMPc a été effectuée en exposant les cellules aux concentrations croissantes de DPDPE. Les données sont exprimées en pourcentage de la valeur maximale obtenue de la situation non désensibilisée pour les récepteurs de type sauvage exposés au véhicule (H_2O). Elles sont représentatives de 6 expériences différentes effectuées en triplicate et une analyse statistique ANOVA à 2 variables nous indique une différence significative entre les 2 courbes ($p = 0.03$). Les lignes noires expriment la désensibilisation des récepteurs WT avec ou sans PP2 pour fin de comparaison avec les récepteurs exposés au saccharose. **Encart supérieur :** Exemple représentatif de la comparaison de la cinétique d'internalisation du récepteur DOR en présence de saccharose avec ou sans PP2. Des cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur de type sauvage δOR marqué à l'épitope Flag ont été exposées à une solution de saccharose (0.4M) pendant 4h). À la dernière heure d'incubation, du PP2 $20\mu\text{M}$ a été ajouté au milieu. Les cellules ont par la suite été mises en présence de DPDPE $1\mu\text{M}$ aux temps indiqués sur la figure. Les données ont été normalisées par rapport au maximum d'internalisation observé avec les récepteurs de type sauvage (WT) lorsqu'ils sont exposés en présence de saccharose seulement. – Résultats publiés dans *JCMM*, 2008¹⁵⁶

4. DISCUSSION

Les RCPG sont connus pour être une cible importante de nombreux médicaments. L'approfondissement des connaissances reliées à leurs mécanismes de signalisation et de régulation est alors primordial. Notre laboratoire vise à étudier les DOR afin de mieux comprendre les voies de signalisation ainsi que les phénomènes de désensibilisation pour éventuellement produire des analgésiques opioïdes avec moins de potentiel de tolérance que ceux actuellement disponibles. Selon nos observations, Src est impliqué dans la voie de signalisation ERK suivant l'activation des récepteurs delta opioïdes ainsi que dans la voie menant à la désensibilisation de ces mêmes récepteurs.

Jusqu'à maintenant, nous savons que suivant la liaison d'un agoniste fort tel que le DPDPE, les récepteurs delta sont stabilisés dans une conformation qui favorise certaines voies de signalisation intracellulaire ainsi que la régulation de leur désensibilisation. De ce fait, les DOR inhibent la production d'AMPc, stimulent les canaux potassium et inhibent les canaux calciques ¹⁶⁰. En ce qui concerne leur régulation, ce sont les GRK ^{161,162} ou d'autres tyrosines kinases qui interviennent au premier plan pour assurer leur processus de désensibilisation homologue. La β -arrestine, chargée du découplage du récepteur et des protéines G, intervient plus tard avec les récepteurs afin qu'ils puissent être endocytés ¹⁶³. Lors de cette étape, la participation de l'AP-2 ¹⁶⁴ ainsi que celle de la dynamine sont nécessaires entre autre pour la formation de vésicules tapissées de clathrine ¹⁶⁵. L'implication des tyrosines kinases dans ce processus a été décrite au niveau de la régulation de l'internalisation

des DOR¹²³ et de la dégradation des MOR¹⁶⁶. Plus récemment, notre laboratoire a démontré la participation de Src dans la régulation du recyclage des DOR¹⁵⁶.

Suite à nos expérimentations, nous arrivons à démontrer un lien entre la stimulation du récepteur delta opioïde et l'activation de la protéine ERK. Nous montrons également que l'activation de la cascade ERK suite à la stimulation des DOR ne dépend pas des RTK ou de la PI3K. Nous établissons plutôt une implication des protéines G ainsi que de la tyrosine kinase Src. En fait, la régulation de Src par la protéine G mène à l'activation de la voie ERK lorsque l'agoniste stimule le récepteur. Cette proposition est basée sur le fait que l'inactivation des protéines Gi/o par le PTX bloque l'activation de Src et interfère avec l'activation de ERK. En plus, le fait que l'activation de la cascade ERK soit inhibée par de fortes concentrations de l'inhibiteur pharmacologique PP2 ou par une forte concentration de mutant inactif de Src démontre l'importance de Src dans l'activation de la cascade MAPK suivant la liaison d'un agoniste aux DOR. Les données acquises nous incitent donc à croire que le récepteur activé par un agoniste active Src d'une manière dépendante des protéines Gi/o, et que Src, à son tour, participe à l'activation de la voie ERK. La stimulation de Src suivant la liaison d'un agoniste au récepteur a déjà été démontré pour les récepteurs à angiotensine II de type 1¹²⁸, pour les récepteurs β 3-adrénergiques⁹⁹ ainsi que pour les récepteurs NK1R¹³⁰. En outre, Src régule négativement la capacité du DOR à stimuler ERK lorsque celui-là est activé par un agoniste. Ainsi, lorsque nous inhibons Src, soit par une faible quantité de mutant dominant négatif, soit par un agent pharmacologique de faible concentration, nous augmentons la réponse cellulaire et prolongeons la phosphorylation de ERK en présence d'un agoniste du DOR. L'effet régulateur de Src sur la signalisation du

récepteur est également perceptible au niveau de la cascade cyclase. En fait, nous avons démontré que l'inhibition de Src protège contre la désensibilisation de DOR via des essais de production d'AMPC. Bref, Src ne participe pas seulement à l'activation de la cascade ERK mais également au niveau de la désensibilisation des récepteurs delta.

En premier lieu, sachant que les MAPK peuvent être activées par 4 mécanismes distincts, i.e. 1) via les seconds messagers 2) via le complexe beta-gamma des protéines G 3) via les RTK ou encore 4) via la β -arrestine, nous avons examiné le mécanisme d'activation les reliant aux récepteurs delta. Dans un premier temps, nous avons établi que l'activation de ERK par les DOR nécessitait la présence de l'hétérotrimère constituant les protéines Gi/o. Cette observation avait déjà été faite il y a longtemps sur de nombreux autres récepteurs tels que les récepteurs α 2-adrénérique¹⁶⁷ et β 3-adrénérique¹⁶⁸, les récepteurs muscariniques M2 à acétylcholine¹⁶⁹, les récepteurs d'acide lysophosphatidique¹⁷⁰ ou encore les récepteurs d' α -thrombine¹⁷¹, puisque avec ces différents types de récepteur la toxine pertussique, connue pour inhiber les protéines Gi/o, interfère avec la phosphorylation de ERK. Nous avons aussi obtenu des résultats préliminaires suggérant que le dimère bêta-gamma soit impliqué dans l'activation de ERK car la sur-expression de ct- β ARK qui lie le dimère inhibe l'activation de la MAPK par l'agoniste des DOR (données non fournies dans cet ouvrage et représentatives d'une expérience). Des études antérieures avaient déjà démontré l'importance de ce dimère en ce qui concerne l'activation de ERK pour les récepteurs α 2-adrénérique ainsi que les récepteurs liant l'acide lysophosphatidique⁸⁰, pour les récepteurs à somatostatine 1⁹³ ou encore pour d'autres types de récepteurs faisant intervenir ces deux sous-unités¹⁷². Notre

laboratoire a par contre établi que l'activation de ERK par les DOR demeurerait indépendante de la PI3K, soit une kinase habituellement recrutée par le dimère bêta-gamma des protéines Gi/o pour stimuler la cascade MAPK¹⁰¹. Ainsi, nous proposons que l'activation de la cascade ERK soit dépendante de la protéine Src de même que du dimère bêta-gamma mais indépendante de la PI3K. Nos résultats appuient ceux de Hedén *et al*¹⁷³ qui avaient démontré, à l'aide de lignées lymphocytaires T Jurkat, que les récepteurs DOR1 ne nécessitaient pas la présence de la PI3K pour stimuler ERK. Le mécanisme proposé par le groupe d'Hedén *et coll* met en jeu une tyrosine kinase puisque la phosphorylation de ERK leur est apparue partiellement sensible à l'herbimycine A^{173,174}. La nécessité d'une tyrosine kinase telle Src ou encore d'un RTK pour activer la voie des MAPK a été établie pour les récepteurs β_2 -⁹⁹ et β_3 -adrénergiques¹⁷⁵ alors exprimés dans les cellules COS-7. Selon nos données, même si la kinase Src est impliquée dans l'activation de ERK, ni les récepteurs à EGF, ni les récepteurs PDGF ne prennent part à ce processus. Ces données nous invitent donc à rejeter les données de Schultz *et coll*¹⁰⁴ et à nous pencher du côté de Kramer *et coll* qui avaient défini, à l'aide la lignée cellulaire HEK-293 utilisée dans nos expériences, que l'activation de la cascade ERK par les DOR ne requérait pas la transphosphorylation des récepteurs EGF¹⁰³. En fait, nous pensons que les observations de Schultz *et coll*¹⁰⁴ selon lesquelles les EGFR seraient impliqués dans l'activation de Erk par DOR étaient biaisées par l'utilisation de PP2 à de très fortes concentrations, soit 100 μ M. À ce niveau, l'ensemble des kinases réceptrices ou non sont inhibées. Nos résultats démontrent également l'absence d'implication du récepteur PDGF, confirmant à nouveau les observations de Kramer *et coll*¹⁰³ qui ont démontré que les récepteurs PDGF contenus dans la lignée cellulaire de gliome C6 n'avaient aucun lien avec l'activation de ERK suivant la liaison d'un agoniste aux

DOR. Au même titre qu'eux, nous constatons que les récepteurs à PDGF ne participent pas à l'activation de ERK par DOR puisqu'ils ne sont pas contenus dans la lignée cellulaire HEK293 utilisée dans notre étude. Il est bien connu que les RCPG utilisent divers modes d'activation des MAPK selon le type cellulaire⁹⁷. Nous savons donc que l'application de nos observations n'est pas nécessairement valable pour tous les types cellulaires.

En second lieu, nous avons constaté à travers nos différentes expérimentations qu'il existait un lien entre le récepteur DOR activé, la kinase Src activée et la protéine ERK. Selon nos trouvailles, l'inhibition pharmacologique de Src ou son inactivation moléculaire produit un effet biphasique sur la stimulation de ERK. Ceci suggère alors que Src régule négativement (i.e empêche) le récepteur à stimuler ERK, mais que Src soit également essentielle à cette stimulation. En d'autres termes, à faible concentration d'inhibiteur ou de mutant inactif de Src, une augmentation de l'amplitude et de la durée de la réponse ERK est perceptible alors qu'à forte concentration, cette protection n'existe plus car la cascade ne se trouve plus stimulée. Src participe donc activement à stimuler ERK et à réguler sa réponse. Ces différentes observations raffermissent le point de vue de Thomas et Brugge^{153,176} qui ont démontré que Src joue un rôle clé dans la modulation de l'efficacité de signalisation des DOR. Ces derniers vont même jusqu'à affirmer que les GPCR ne régulent pas seulement l'activation des tyrosines kinases de la famille de Src mais qu'elles pourraient contrôler l'activité fonctionnelle des récepteurs. Cette famille de kinase a donc une versatilité qui leur permet de se comporter à la fois comme des effecteurs et des régulateurs, favorisant en plus une interaction entre différents

récepteurs. En fait, PP2 arrive à prolonger l'amplitude et la durée de l'activation de la cascade ERK par l'agoniste DPDPE.

En troisième lieu, nous avons remarqué que Src, en plus de réguler la réponse ERK, avait un effet régulateur sur la voie de signalisation menant à l'inhibition de la production d'AMPC, puisque l'inhibition pharmacologique ou moléculaire de Src protège le DOR du processus de désensibilisation habituel. Jusqu'à maintenant, aucune donnée publiée dans la littérature n'établit de lien entre la désensibilisation fonctionnelle du DOR et l'activité de Src. En effet, la plupart des expérimentations appuyaient le modèle basé sur la sur-expression des GRK ou des β -arrestines ou encore sur l'expression d'un mutant dominant négatif de ces mêmes protéines respectives. Cela avait pour effet de modifier positivement ou négativement la désensibilisation des récepteurs opioïdes¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Cependant, des données divulguées par le groupe de Qiu¹⁸⁰ font état d'une faible protection contre la désensibilisation de la cascade inhibant l'adénylate cyclase en présence de récepteurs ayant les résidus Ser/Thr de l'extrémité C-terminale mutés en résidus alanines (récepteurs ainsi non-phosphorylables en ces sites cibles par les GRK). Cependant, selon nos données, il existe une désensibilisation similaire entre le DOR de type sauvage et le DOR tronqué (n'ayant donc pas les résidus Ser/Thr de l'extrémité C-Terminale), indiquant que les résidus Ser/Thr ne soient pas les seuls à intervenir dans le processus de désensibilisation. Bien que ces observations ne contredisent pas le mécanisme classique selon lequel un échaffaudage entre le DOR phosphorylé et la β -arrestine pourrait contribuer à la désensibilisation, elles nous amènent à nous demander de quelle manière Src contribue à la désensibilisation des DOR. Il nous est apparu logique de vérifier si l'effet protecteur des inhibiteurs de Src contre la

désensibilisation pourrait avoir un impact sur l'internalisation puisqu'il s'agit d'une étape importante du processus de régulation de la signalisation. Nos résultats prouvent qu'à des concentrations qui protègent contre la désensibilisation, ni PP2 ni le mutant inactif de Src n'interfèrent avec le processus d'internalisation du récepteur. Ainsi, à la lumière de nos données, l'inhibition de Src joue un rôle prépondérant dans les mécanismes de désensibilisation sans toutefois modifier la cinétique d'internalisation.

Finalement, nous nous sommes intéressés à comprendre si une internalisation optimale était requise pour que l'inhibition de Src soit évidente. Dans cet optique, nous avons analysé le comportement des récepteurs tronqués, dont le processus d'internalisation est connu pour être sous-optimal ¹³⁸. Malgré le fait que ces récepteurs aient un niveau d'internalisation inférieur à celui des récepteurs sauvages, leur comportement face à l'inhibiteur PP2 nous oriente à nouveau vers une régulation du récepteur par Src puisque un effet protecteur contre la désensibilisation est perceptible. Cependant, l'efficacité de PP2 à protéger contre la désensibilisation par un agoniste est moindre car la protection ne devient apparente qu'aux fortes concentrations de l'agoniste DPDPE. Nous avons également testé l'impact du saccharose sur la désensibilisation des récepteurs en présence de PP2 puisque cette solution est connue pour inhiber la formation de vésicules tapissées de clathrines et par conséquent, l'endocytose du récepteur ¹⁸¹. À nouveau, PP2 arrive à protéger les récepteurs de la désensibilisation. Cependant, l'amplitude de protection octroyée par le PP2 en présence de saccharose est minimale lorsque comparée à la situation contrôle ou encore aux récepteurs tronqués. Par contre, nous ne pouvons exclure qu'une diminution de la protection par PP2 ne soit pas reliée à la suractivation de Src

puisque nous n'avons pas vérifié l'effet du succharose sur l'activité de Src. Cela dit, il semble que plus l'internalisation soit affectée, moins le PP2 n'engendre son effet de protection contre la désensibilisation des DOR. En plus, la stimulation des DOR par un agoniste en présence de saccharose réduit leur réactivité basale face à l'inhibition de la production d'AMPc. En fait, il a déjà été démontré que le saccharose interférait avec l'internalisation constitutive des récepteurs, un mécanisme normalement responsable de maintenir un niveau basal de récepteurs actifs à la surface membranaire ^{182,183}. Il n'est donc pas surprenant de noter un amoindrissement de l'effet des agonistes chez les DOR exposés au saccharose de même qu'une diminution de l'effet protecteur des inhibiteurs de Src sur la désensibilisation.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cet ouvrage avait 2 mandats bien distincts : d'abord, de caractériser le mécanisme d'activation de la protéine ERK suivant la liaison d'un agoniste à DOR et ensuite, de vérifier si la kinase Src participait au phénomène de désensibilisation. Nos efforts nous indiquent que ERK est activé via les protéines G indépendamment de la PI3K ou des RTK mais via la kinase Src. Cette dernière participe aussi à la régulation du récepteur. En ce sens, nous avons démontré que le récepteur stimulé par un agoniste active Src via les protéines G, ce qui a pour conséquence de diriger le récepteur vers les mécanismes de désensibilisation. En fait, Src participe à la désensibilisation des DOR sans modifier leur internalisation. Néanmoins, l'internalisation optimale semble obligatoire pour que les bloqueurs de Src puissent exercer leur effet protecteur, indiquant que le site d'action de la tyrosine kinase est post-endocytaire. Des membres de notre laboratoire se sont penchés sur cette question. Leur conclusion s'oriente vers la modulation du processus de recyclage des récepteurs et de leur resensibilisation ¹⁵⁶. La figure 25 résume nos observations par rapport au rôle de Src dans l'activation de ERK ainsi que sa contribution au cycle de désensibilisation et resensibilisation. Bien qu'on ait aussi démontré que Src phosphoryle le récepteur ¹⁵⁶, il reste à déterminer si la régulation du recyclage par Src dépend de la phosphorylation du DOR même ou des protéines de triage responsables du trafic des récepteurs une fois internalisés.

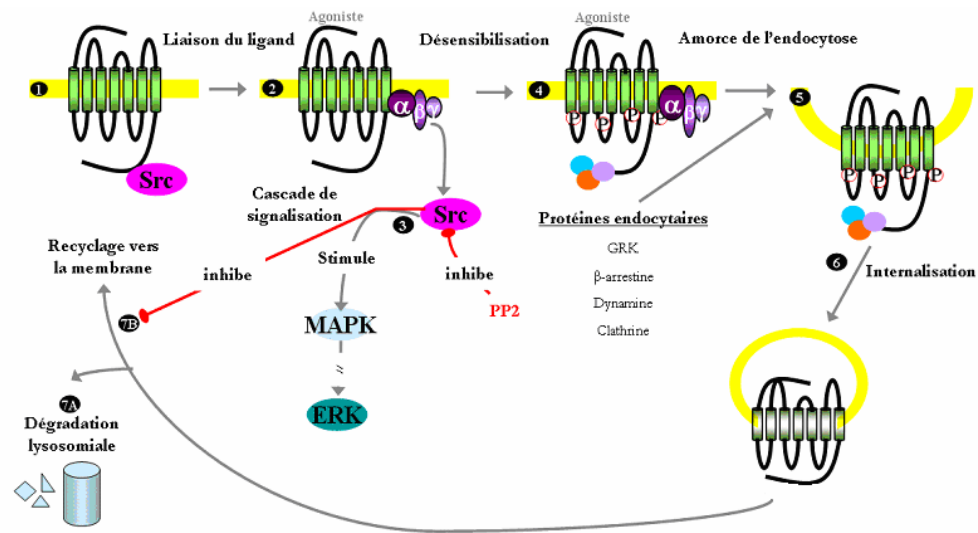


Figure 25. Schématisation de l'interaction entre la protéine Src et le DOR suivant la liaison d'un agoniste. Src se retrouve à proximité de la membrane basale et interagit avec le récepteur de façon basale (1). Une fois la liaison d'un agoniste au récepteur, les protéines G stimulent Src (2) qui, à son tour, active la voie des MAPK (3). Par la suite, le récepteur est phosphorylé par des kinases phosphorylant les résidus Ser/Thr ainsi que Tyr (4). Le récepteur phosphorylé interagit plus facilement avec la β -arrestine qui déclenche l'internalisation (5) via des vésicules endocytaires tapissées de clathrine (6). À ce moment, le récepteur peut être soit dégradé au niveau des lysosomes (7A), soit il peut être recyclé à la membrane (7B), étape favorisée par les inhibiteurs de Src pour y être à nouveau stimulé par un ligand. L'interaction constitutive de Src avec les DORs et sa libération lors de l'activation du récepteur est décrite en détail dans l'article récemment publié par Archer-Lahlou *et al.*, 2008¹⁵⁶.

6. RÉFÉRENCES

1. Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 2001;**22**(7):368-76.
2. Ferguson SSG. Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling. *Pharmacological Reviews* 2001;**53**(1):1-24.
3. Hall RA, Premont RT, Lefkowitz RJ. Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol* 1999;**145**(5):927-32.
4. Ellis C. Twenty questions: the state of GPCR research in 2004 *Nature Reviews Drug Discovery* 2004;**3**:577-626
5. Birnbaumer L, Brown AM. G proteins and the mechanism of action of hormones, neurotransmitters, and autocrine and paracrine regulatory factors. *Am Rev Respir Dis* 1990;**141**(3 Pt 2):S106-14.
6. Kieffer BL. Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci* 1999;**20**(1):19-26.
7. Adler MW, Geller EB, Rogers TJ, Henderson EE, Eisenstein TK. Opioids, receptors, and immunity. *Adv Exp Med Biol* 1993;**335**:13-20.
8. Shook JE, Watkins WD, Camporesi EM. Differential roles of opioid receptors in respiration, respiratory disease, and opiate-induced respiratory depression. *Am Rev Respir Dis* 1990;**142**(4):895-909.
9. Handler CM, Geller EB, Adler MW. Effect of mu-, kappa-, and delta-selective opioid agonists on thermoregulation in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1992;**43**(4):1209-16.
10. Kromer W. Endogenous and exogenous opioids in the control of gastrointestinal motility and secretion. *Pharmacol Rev* 1988;**40**(2):121-62.
11. Colpaert FC. System theory of pain and of opiate analgesia: no tolerance to opiates. *Pharmacol Rev* 1996;**48**(3):355-402.
12. Kreek MJ. Opioid receptors: some perspectives from early studies of their role in normal physiology, stress responsivity, and in specific addictive diseases. *Neurochem Res* 1996;**21**(11):1469-88.

13. Harrison C, Smart D, Lambert DG. Stimulatory effects of opioids. *Br J Anaesth* 1998;**81**(1):20-8.
14. Marie N, Aguila B, Allouche S. Tracking the opioid receptors on the way of desensitization. *Cell Signal* 2006.
15. Paterlini MG. The function of the extracellular regions in opioid receptor binding: insights from computational biology. *Curr Top Med Chem* 2005;**5**(3):357-67.
16. Satoh M, Minami M. Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol Ther* 1995;**68**(3):343-64.
17. Zaki PA, Bilsky EJ, Vanderah TW, Lai J, Evans CJ, Porreca F. Opioid receptor types and subtypes: the delta receptor as a model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;**36**:379-401.
18. Whistler JL, Enquist J, Marley A, et al. Modulation of Postendocytic Sorting of G Protein-Coupled Receptors. *Science* 2002;**297**(5581):615-620.
19. Tanowitz M, von Zastrow M. A Novel Endocytic Recycling Signal That Distinguishes the Membrane Trafficking of Naturally Occurring Opioid Receptors. *J. Biol. Chem.* 2003;**278**(46):45978-45986.
20. Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Walker P, Bouvier M. Export from the Endoplasmic Reticulum Represents the Limiting Step in the Maturation and Cell Surface Expression of the Human delta Opioid Receptor. *J. Biol. Chem.* 2000;**275**(18):13727-13736.
21. Surratt CK, Adams WR. G protein-coupled receptor structural motifs: relevance to the opioid receptors. *Curr Top Med Chem* 2005;**5**(3):315-24.
22. Petaja-Repo UE, Hogue M, Leskela TT, Markkanen PM, Tuusa JT, Bouvier M. Distinct subcellular localization for constitutive and agonist-modulated palmitoylation of the human delta opioid receptor. *J Biol Chem* 2006;**281**(23):15780-9.
23. Appleyard SM, McLaughlin JP, Chavkin C. Tyrosine phosphorylation of the kappa -opioid receptor regulates agonist efficacy. *J Biol Chem* 2000;**275**(49):38281-5.
24. McLaughlin JP, Chavkin C. Tyrosine phosphorylation of the mu-opioid receptor regulates agonist intrinsic efficacy. *Mol Pharmacol* 2001;**59**(6):1360-8.
25. Wess J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* 1998;**80**(3):231-64.

26. Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 2000;**21**(1):90-113.
27. Bodnar RJ, Klein GE. Endogenous opiates and behavior: 2004. *Peptides* 2005;**26**(12):2629-2711.
28. Pasternak GW. Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. *Clin Neuropharmacol* 1993;**16**(1):1-18.
29. Giros B, Pohl M, Rochelle JM, Seldin MF. Chromosomal localization of opioid peptide and receptor genes in the mouse. *Life Sci* 1995;**56**(18):PL369-75.
30. Pan L, Xu J, Yu R, Xu MM, Pan YX, Pasternak GW. Identification and characterization of six new alternatively spliced variants of the human mu opioid receptor gene, Oprm. *Neuroscience* 2005;**133**(1):209-20.
31. Levac BA, O'Dowd BF, George SR. Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units. *Curr Opin Pharmacol* 2002;**2**(1):76-81.
32. Yuferov V, Fussell D, LaForge KS, et al. Redefinition of the human kappa opioid receptor gene (OPRK1) structure and association of haplotypes with opiate addiction. *Pharmacogenetics* 2004;**14**(12):793-804.
33. Clarke S, Chen Z, Hsu M-S, Pintar J, Hill R, Kitchen I. Quantitative autoradiographic mapping of the ORL1, [mu]-, [delta]- and [kappa]-receptors in the brains of knockout mice lacking the ORL1 receptor gene. *Brain Research* 2001;**906**(1-2):13-24.
34. Holden JE, Jeong Y, Forrest JM. The endogenous opioid system and clinical pain management. *AACN Clin Issues* 2005;**16**(3):291-301.
35. Stein C, Yassouridis A. Editorial. *Pain* 1997;**71**(2):119-121.
36. Lynn B, Perl ER. Failure of acupuncture to produce localized analgesia. *Pain* 1977;**3**(4):339-51.
37. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower R. Pharmacology. sixth edition ed: Churchill Livingstone, 2007.
38. Marchand S. Les douleurs d'origine centrale : quand la douleur est entre les deux oreilles. *Le Clinicien* 2005;pp 59-62.
39. Schoffelmeer AN, De Vries TJ, Hogenboom F, Mulder AH. Mu- and delta-opioid receptors inhibitorily linked to dopamine-sensitive adenylate cyclase in rat striatum display a selectivity profile toward endogenous opioid peptides different

from that of presynaptic mu, delta and kappa receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;**267**(1):205-10.

40. Blumenfeld H. Neuroanatomy Through Clinical Cases, 2002.

41. Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 2006;**29**:565-98.

42. Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 2005;**8**(11):1445-9.

43. Szeto HH, Soong Y, Wu D, et al. Respiratory depression after intravenous administration of delta-selective opioid peptide analogs. *Peptides* 1999;**20**(1):101-5.

44. Petrillo P, Angelici O, Bingham S, et al. Evidence for a selective role of the delta-opioid agonist [8R-(4bS*,8aalpha,8abeta, 12bbeta)] 7,10-Dimethyl-1-methoxy-11-(2-methylpropyl) oxycarbonyl 5,6,7,8,12,12b-hexahydro-(9H)-4,8-methanobenzofuro [3,2-e] pyrrolo [2,3-g] iso quinoline hydrochloride (SB-235863) in blocking hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain responses. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;**307**(3):1079-89.

45. Cheng PY, Svingos AL, Wang H, et al. Ultrastructural immunolabeling shows prominent presynaptic vesicular localization of delta-opioid receptor within both enkephalin- and nonenkephalin-containing axon terminals in the superficial layers of the rat cervical spinal cord. *J Neurosci* 1995;**15**(9):5976-88.

46. Cahill CM, Morinville A, Lee MC, Vincent JP, Collier B, Beaudet A. Prolonged morphine treatment targets delta opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances delta-mediated antinociception. *J Neurosci* 2001;**21**(19):7598-607.

47. Cahill CM, Morinville A, Hoffert C, O'Donnell D, Beaudet A. Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain* 2003;**101**(1-2):199-208.

48. Gendron L, Lucido AL, Mennicken F, et al. Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic delta-opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci* 2006;**26**(3):953-62.

49. Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 1977;**267**(5611):495-9.

50. Chen Y, Mestek A, Liu J, Yu L. Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem J* 1993;**295** (Pt 3):625-8.

51. Chen Y, Yu L. Differential regulation by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C of the mu opioid receptor coupling to a G protein-activated K⁺ channel. *J Biol Chem* 1994;**269**(11):7839-42.
52. Chen JC, Smith ER, Cahill M, Cohen R, Fishman JB. The opioid receptor binding of dezocine, morphine, fentanyl, butorphanol and nalbuphine. *Life Sci* 1993;**52**(4):389-96.
53. Yasuda K, Raynor K, Kong H, et al. Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**(14):6736-40.
54. Simon EJ. Opioid receptors and endogenous opioid peptides. *Med Res Rev* 1991;**11**(4):357-74.
55. Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science* 2002;**296**(5573):1636-9.
56. Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, et al. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* 2003;**24**(6):765-81.
57. Decaillot FM, Befort K, Filliol D, Yue S, Walker P, Kieffer BL. Opioid receptor random mutagenesis reveals a mechanism for G protein-coupled receptor activation. *Nat Struct Biol* 2003;**10**(8):629-36.
58. Bunemann M, Frank M, Lohse MJ. Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**(26):16077-82.
59. Frank M, Thumer L, Lohse MJ, Bunemann M. G Protein Activation without Subunit Dissociation Depends on a G α i-specific Region. *J. Biol. Chem.* 2005;**280**(26):24584-24590.
60. Gales C, Van Durm JJJ, Schaak S, et al. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* 2006;**advanced online publication**.
61. Sternweis PC. The active role of beta gamma in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 1994;**6**(2):198-203.
62. Camps M, Hou C, Sidiropoulos D, Stock JB, Jakobs KH, Gierschik P. Stimulation of phospholipase C by guanine-nucleotide-binding protein beta gamma subunits. *Eur J Biochem* 1992;**206**(3):821-31.

63. Krapivinsky G, Krapivinsky L, Wickman K, Clapham DE. G beta gamma binds directly to the G protein-gated K⁺ channel, IKACH. *J Biol Chem* 1995;**270**(49):29059-62.
64. Lesage F, Guillemare E, Fink M, et al. Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem* 1995;**270**(48):28660-7.
65. Lesage F, Fink M, Barhanin J, Lazdunski M, Mattei MG. Assignment of human G-protein-coupled inward rectifier K⁺ channel homolog GIRK3 gene to chromosome 1q21-q23. *Genomics* 1995;**29**(3):808-9.
66. Ikeda SR. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 1996;**380**(6571):255-8.
67. Tang WJ, Gilman AG. Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science* 1991;**254**(5037):1500-3.
68. Gilman AG. Transmembrane signaling, G proteins, and adenylyl cyclase. *Harvey Lect* 1989;**85**:153-72.
69. Mattingly RR, Macara IG. Phosphorylation-dependent activation of the Ras-GRF/CDC25Mm exchange factor by muscarinic receptors and G-protein beta gamma subunits. *Nature* 1996;**382**(6588):268-72.
70. Pumiglia KM, LeVine H, Haske T, Habib T, Jove R, Decker SJ. A direct interaction between G-protein beta gamma subunits and the Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem* 1995;**270**(24):14251-4.
71. Ma Y-C, Huang J, Ali S, Lowry W, Huang X-Y. Src Tyrosine Kinase Is a Novel Direct Effector of G Proteins. *Cell* 2000;**102**(5):635-646.
72. Ingram SL, Vaughan CW, Bagley EE, Connor M, Christie MJ. Enhanced opioid efficacy in opioid dependence is caused by an altered signal transduction pathway. *J Neurosci* 1998;**18**(24):10269-76.
73. Ingram SL, Williams JT. Opioid inhibition of I_h via adenylyl cyclase. *Neuron* 1994;**13**(1):179-86.
74. Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 2001;**81**(1):299-343.
75. Onali P, Olanas MC. Naturally occurring opioid receptor agonists stimulate adenylyl cyclase activity in rat olfactory bulb. *Mol Pharmacol* 1991;**39**(4):436-41.

76. Cruciani RA, Dvorkin B, Morris SA, Crain SM, Makman MH. Direct coupling of opioid receptors to both stimulatory and inhibitory guanine nucleotide-binding proteins in F-11 neuroblastoma-sensory neuron hybrid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**(7):3019-23.
77. Narita M, Ioka M, Suzuki M, Narita M, Suzuki T. Effect of repeated administration of morphine on the activity of extracellular signal regulated kinase in the mouse brain. *Neurosci Lett* 2002;**324**(2):97-100.
78. English JM, Pearson G, Hockenberry T, Shivakumar L, White MA, Cobb MH. Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control. *J Biol Chem* 1999;**274**(44):31588-92.
79. Derkinderen P, Enslen H, Girault JA. The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system. *Neuroreport* 1999;**10**(5):R24-34.
80. van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, Lefkowitz RJ. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 1996;**17**(6):698-714.
81. Sugden PH, Clerk A. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal* 1997;**9**(5):337-51.
82. Luttrell LM, Daaka Y, Della Rocca GJ, Lefkowitz RJ. G Protein-coupled Receptors Mediate Two Functionally Distinct Pathways of Tyrosine Phosphorylation in Rat 1a Fibroblasts. Shc PHOSPHORYLATION AND RECEPTOR ENDOCYTOSIS CORRELATE WITH ACTIVATION OF Erk KINASES. *J. Biol. Chem.* 1997;**272**(50):31648-31656.
83. Lefkowitz RJ. G Protein-coupled Receptors. III. NEW ROLES FOR RECEPTOR KINASES AND beta -ARRESTINS IN RECEPTOR SIGNALING AND DESENSITIZATION. *J. Biol. Chem.* 1998;**273**(30):18677-18680.
84. Huot J, Houle F, Marceau F, Landry J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1997;**80**(3):383-92.
85. Elorza A, Penela P, Sarnago S, Mayor F, Jr. MAPK-dependent Degradation of G Protein-coupled Receptor Kinase 2. *J. Biol. Chem.* 2003;**278**(31):29164-29173.
86. Ignatova EG, Belcheva MM, Bohn LM, Neuman MC, Coscia CJ. Requirement of receptor internalization for opioid stimulation of mitogen-activated protein kinase: biochemical and immunofluorescence confocal microscopic evidence. *J Neurosci* 1999;**19**(1):56-63.

87. Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, et al. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 1998;**93**(4):605-15.
88. Impey S, Obrietan K, Storm DR. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* 1999;**23**(1):11-4.
89. Luttrell LM. Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;**80**(5):375-82.
90. Lefkowitz RJ, Pierce KL, Luttrell LM. Dancing with Different Partners: Protein Kinase A Phosphorylation of Seven Membrane-Spanning Receptors Regulates Their G Protein-Coupling Specificity. *Mol Pharmacol* 2002;**62**(5):971-974.
91. de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 1998;**396**(6710):474-7.
92. Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R. Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 1997;**275**(5298):394-7.
93. Florio T, Yao H, Carey KD, Dillon TJ, Stork PJ. Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1). *Mol Endocrinol* 1999;**13**(1):24-37.
94. Polakiewicz RD, Schieferl SM, Dorner LF, Kansra V, Comb MJ. A mitogen-activated protein kinase pathway is required for mu-opioid receptor desensitization. *J Biol Chem* 1998;**273**(20):12402-6.
95. Polakiewicz RD, Schieferl SM, Gingras AC, Sonenberg N, Comb MJ. mu-Opioid receptor activates signaling pathways implicated in cell survival and translational control. *J Biol Chem* 1998;**273**(36):23534-41.
96. Schafer B, Marg B, Gschwind A, Ullrich A. Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. *J Biol Chem* 2004;**279**(46):47929-38.
97. Gutkind JS. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 1998;**273**(4):1839-42.
98. Gutkind JS. Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* 1998;**17**(11 Reviews):1331-42.

99. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 1999;**283**(5402):655-61.
100. Azzi M, Charest PG, Angers S, et al. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**(20):11406-11.
101. Belcheva MM, Vogel Z, Ignatova E, et al. Opioid Modulation of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Activity Is Ras-Dependent and Involves G Subunits. *Journal of Neurochemistry* 1998;**70**(2):635-645.
102. Belcheva MM, Clark AL, Haas PD, et al. Mu and kappa opioid receptors activate ERK/MAPK via different protein kinase C isoforms and secondary messengers in astrocytes. *J Biol Chem* 2005;**280**(30):27662-9.
103. Kramer HK, Onoprishvili I, Andria M, et al. Delta Opioid activation of the Mitogen-activated protein kinase cascade does not require transphosphorylation of Receptor Tyrosine Kinases. *BMC Pharmacology* 2002;**2**(1):5.
104. Schulz R, Eisinger DA, Wehmeyer A. Opioid control of MAP kinase cascade. *European Journal of Pharmacology* 2004;**500**(1-3):487-497.
105. Kramer HK, Simon EJ. [mu] and [delta]-opioid receptor agonists induce mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the absence of receptor internalization. *Neuropharmacology* 2000;**39**(10):1707-1719.
106. Pierce KL, Maudsley S, Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Role of endocytosis in the activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by sequestering and nonsequestering G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**(4):1489-94.
107. Frame MC. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 2002;**1602**(2):114-30.
108. Irby RB, Yeatman TJ. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 2000;**19**(49):5636-42.
109. Brown MT, Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1996;**1287**(2-3):121-49.
110. Matsuda M, Mayer BJ, Fukui Y, Hanafusa H. Binding of transforming protein, P47gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science* 1990;**248**(4962):1537-9.

111. Moran MF, Koch CA, Anderson D, et al. Src Homology Region 2 Domains Direct Protein-Protein Interactions in Signal Transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990;**87**(21):8622-8626.
112. Okada M, Nada S, Yamanashi Y, Yamamoto T, Nakagawa H. CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *J. Biol. Chem.* 1991;**266**(36):24249-24252.
113. Martin GS. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;**2**(6):467-75.
114. Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 2004;**23**(48):7906-9.
115. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 2002;**115**(Pt 3):455-65.
116. Pineyro G, Archer-Lahlou E. Ligand-specific receptor states: implications for opiate receptor signalling and regulation. *Cell Signal* 2007;**19**(1):8-19.
117. von Zastrow M. Mechanisms regulating membrane trafficking of G protein-coupled receptors in the endocytic pathway. *Life Sci* 2003;**74**(2-3):217-24.
118. Chu P, Murray S, Lissin D, von Zastrow M. Delta and kappa opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist. *J Biol Chem* 1997;**272**(43):27124-30.
119. Tanowitz M, von Zastrow M. Ubiquitination-independent Trafficking of G Protein-coupled Receptors to Lysosomes. *J. Biol. Chem.* 2002;**277**(52):50219-50222.
120. Menard L, Ferguson SSG, Zhang J, et al. Synergistic Regulation of beta 2-Adrenergic Receptor Sequestration: Intracellular Complement of beta -Adrenergic Receptor Kinase and beta -Arrestin Determine Kinetics of Internalization. *Mol Pharmacol* 1997;**51**(5):800-808.
121. Trapaidze N, Keith DE, Cvejic S, Evans CJ, Devi LA. Sequestration of the delta opioid receptor. Role of the C terminus in agonist-mediated internalization. *J Biol Chem* 1996;**271**(46):29279-85.
122. Whistler JL, Tsao P, von Zastrow M. A Phosphorylation-regulated Brake Mechanism Controls the Initial Endocytosis of Opioid Receptors but Is Not Required for Post-endocytic Sorting to Lysosomes. *J. Biol. Chem.* 2001;**276**(36):34331-34338.
123. Kramer HK, Andria ML, Esposito DH, Simon EJ. Tyrosine phosphorylation of the [delta]-opioid receptor: Evidence for its role in mitogen-activated protein

kinase activation and receptor internalization*. *Biochemical Pharmacology* 2000;**60**(6):781-792.

124. Kramer HK, Andria ML, Kushner SA, Esposito DH, Hiller JM, Simon EJ. Mutation of tyrosine 318 (Y318F) in the delta-opioid receptor attenuates tyrosine phosphorylation, agonist-dependent receptor internalization, and mitogen-activated protein kinase activation. *Molecular Brain Research* 2000;**79**(1-2):55-66.

125. Barak LS, Menard L, Ferguson SS, Colapietro AM, Caron MG. The conserved seven-transmembrane sequence NP(X)₂Y of the G-protein-coupled receptor superfamily regulates multiple properties of the beta 2-adrenergic receptor. *Biochemistry* 1995;**34**(47):15407-14.

126. Sarnago S, Elorza A, Mayor F, Jr. Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1999;**274**(48):34411-6.

127. Fan G-f, Shumay E, Malbon CC, Wang H-y. c-Src Tyrosine Kinase Binds the beta 2-Adrenergic Receptor via Phospho-Tyr-350, Phosphorylates G-protein-linked Receptor Kinase 2, and Mediates Agonist-induced Receptor Desensitization. *J. Biol. Chem.* 2001;**276**(16):13240-13247.

128. Fessart D, Simaan M, Laporte SA. c-Src Regulates Clathrin Adapter Protein 2 Interaction with {beta}-Arrestin and the Angiotensin II Type 1 Receptor during Clathrin- Mediated Internalization. *Mol Endocrinol* 2005;**19**(2):491-503.

129. Szaszak M, Gaborik Z, Turu G, et al. Role of the Proline-rich Domain of Dynamin-2 and Its Interactions with Src Homology 3 Domains during Endocytosis of the AT1 Angiotensin Receptor. *J. Biol. Chem.* 2002;**277**(24):21650-21656.

130. DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, Nishijima D, Dery O, Bunnett NW. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *PNAS* 2000;**97**(20):11086-11091.

131. Ahn S, Maudsley S, Luttrell LM, Lefkowitz RJ, Daaka Y. Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 1999;**274**(3):1185-8.

132. Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, et al. The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**(7):3712-7.

133. Wilde A, Beattie EC, Lem L, et al. EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* 1999;**96**(5):677-87.
134. Valiquette M, Vu HK, Yue SY, Wahlestedt C, Walker P. Involvement of Trp-284, Val-296, and Val-297 of the human delta-opioid receptor in binding of delta-selective ligands. *J Biol Chem* 1996;**271**(31):18789-96.
135. Guan XM, Kobilka TS, Kobilka BK. Enhancement of membrane insertion and function in a type IIIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide. *J. Biol. Chem.* 1992;**267**(31):21995-21998.
136. Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Walker P, Bouvier M. Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor. *J Biol Chem* 2000;**275**(18):13727-36.
137. Pineyro G, Azzi M, De Lean A, Schiller P, Bouvier M. Short-term inverse-agonist treatment induces reciprocal changes in delta-opioid agonist and inverse-agonist binding capacity. *Mol Pharmacol* 2001;**60**(4):816-27.
138. Murray SR, Evans CJ, von Zastrow M. Phosphorylation Is Not Required for Dynamin-dependent Endocytosis of a Truncated Mutant Opioid Receptor. *J. Biol. Chem.* 1998;**273**(39):24987-24991.
139. Lavoie C, Mercier JF, Salahpour A, et al. Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem* 2002;**277**(38):35402-10.
140. Terrillon S, Bouvier M. Receptor activity-independent recruitment of betaarrestin2 reveals specific signalling modes. *Embo J* 2004;**23**(20):3950-61.
141. Natarajan K, Berk BC. Crosstalk coregulation mechanisms of G protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases. *Methods Mol Biol* 2006;**332**:51-77.
142. Pyne NJ, Waters C, Moughal NA, et al. Experimental Systems for Studying the Role of G-Protein-Coupled Receptors in Receptor Tyrosine Kinase Signal Transduction. *Methods in Enzymology*: Academic Press, 2004: 451-475.
143. Liebmann C, Bohmer FD. Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling. *Curr Med Chem* 2000;**7**(9):911-43.
144. Lowes VL, Ip NY, Wong YH. Integration of signals from receptor tyrosine kinases and g protein-coupled receptors. *Neurosignals* 2002;**11**(1):5-19.

145. Krymskaya VP, Orsini MJ, Eszterhas AJ, et al. Mechanisms of proliferation synergy by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor activation in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;**23**(4):546-54.
146. Piiper A, Zeuzem S. Receptor tyrosine kinases are signaling intermediates of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des* 2004;**10**(28):3539-45.
147. Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, et al. Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 1995;**269**(5224):690-3.
148. Kurosu H, Maehama T, Okada T, et al. Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110beta is synergistically activated by the betagamma subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide. *J Biol Chem* 1997;**272**(39):24252-6.
149. Morris AJ, Rudge SA, Mahlum CE, Jenco JM. Regulation of phosphoinositide-3-kinase by G protein beta gamma subunits in a rat osteosarcoma cell line. *Mol Pharmacol* 1995;**48**(3):532-9.
150. Kodaki T, Woscholski R, Hallberg B, Rodriguez-Viciana P, Downward J, Parker PJ. The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr Biol* 1994;**4**(9):798-806.
151. Gerhardt CC, Gros J, Strosberg AD, Issad T. Stimulation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway by Human Beta-3 Adrenergic Receptor: New Pharmacological Profile and Mechanism of Activation. *Mol Pharmacol* 1999;**55**(2):255-262.
152. Slomiany BL, Slomiany A. Src-kinase-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in salivary mucin secretion in response to beta-adrenergic G-protein-coupled receptor activation. *Inflammopharmacology* 2004;**12**(3):233-45.
153. Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;**13**:513-609.
154. Ma YC, Huang XY. Novel regulation and function of Src tyrosine kinase. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 2002;**59**(3):456-462.
155. Audet N, Paquin-Gobeil M, Landry-Paquet O, Schiller PW, Pineyro G. Internalization and Src activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligands. *J Biol Chem* 2005;**280**(9):7808-16.
156. Archer-Lahlou E, Audet N, Amraei MG, Huard K, Paquin-Gobeil M, Pineyro G. Src promotes delta opioid receptor (DOR) desensitization by interfering with receptor recycling. *J Cell Mol Med* 2008.

157. Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* 2002;**66**(2):61-79.
158. Kristiansen K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 2004;**103**(1):21-80.
159. Trapaidze N, Gomes I, Bansinath M, Devi LA. Recycling and Resensitization of Delta Opioid Receptors. *DNA and Cell Biology* 2000;**19**(4):195-204.
160. Zollner C, Stein C. Opioids. *Handb Exp Pharmacol* 2007(177):31-63.
161. Hasbi A, Allouche S, Sichel F, et al. Internalization and recycling of delta-opioid receptor are dependent on a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;**293**(1):237-47.
162. Pei G, Kieffer BL, Lefkowitz RJ, Freedman NJ. Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C. *Mol Pharmacol* 1995;**48**(2):173-7.
163. Eisinger DA, Schulz R. Mechanism and consequences of delta-opioid receptor internalization. *Crit Rev Neurobiol* 2005;**17**(1):1-26.
164. Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, Barak LS, Caron MG. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 2000;**275**(30):23120-6.
165. Bohm SK, Khitin LM, Smeekens SP, Grady EF, Payan DG, Bunnett NW. Identification of potential tyrosine-containing endocytic motifs in the carboxyl-tail and seventh transmembrane domain of the neurokinin 1 receptor. *J Biol Chem* 1997;**272**(4):2363-72.
166. Pak Y, O'Dowd BF, Wang JB, George SR. Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down-regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1999;**274**(39):27610-6.
167. Alblas J, van Corven EJ, Hordijk PL, Milligan G, Moolenaar WH. Gi-mediated activation of the p21ras-mitogen-activated protein kinase pathway by alpha 2-adrenergic receptors expressed in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1993;**268**(30):22235-22238.

168. Soeder KJ, Snedden SK, Cao W, et al. The β_3 -Adrenergic Receptor Activates Mitogen-activated Protein Kinase in Adipocytes through a Gi-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 1999;**274**(17):12017-12022.
169. Winitz S, Russell M, Qian NX, Gardner A, Dwyer L, Johnson GL. Involvement of Ras and Raf in the Gi-coupled acetylcholine muscarinic m2 receptor activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase and MAP kinase. *J. Biol. Chem.* 1993;**268**(26):19196-19199.
170. Howe LR, Marshall CJ. Lysophosphatidic acid stimulates mitogen-activated protein kinase activation via a G-protein-coupled pathway requiring p21ras and p74raf-1. *J. Biol. Chem.* 1993;**268**(28):20717-20720.
171. van Corven EJ, Hordijk PL, Medema RH, Bos JL, Moolenaar WH. Pertussis Toxin-Sensitive Activation of p21ras by G Protein-Coupled Receptor Agonists in Fibroblasts. *PNAS* 1993;**90**(4):1257-1261.
172. Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ. Gbeta gamma Subunits Mediate Src-dependent Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor. A SCAFFOLD FOR G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR-MEDIATED Ras ACTIVATION. *J. Biol. Chem.* 1997;**272**(7):4637-4644.
173. Hedin KE, Bell MP, Huntoon CJ, Karnitz LM, McKean DJ. Gi Proteins Use a Novel beta gamma - and Ras-independent Pathway to Activate Extracellular Signal-regulated Kinase and Mobilize AP-1 Transcription Factors in Jurkat T Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 1999;**274**(28):19992-20001.
174. Uehara Y, Fukazawa H, Murakami Y, Mizuno S. Irreversible inhibition of v-src tyrosine kinase activity by herbimycin a and its abrogation by sulfhydryl compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989;**163**(2):803-809.
175. Cao W, Luttrell LM, Medvedev AV, et al. Direct Binding of Activated c-Src to the beta 3-Adrenergic Receptor Is Required for MAP Kinase Activation. *J. Biol. Chem.* 2000;**275**(49):38131-38134.
176. Thomas SM, Brugge JS. CELLULAR FUNCTIONS REGULATED BY SRC FAMILY KINASES. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1997;**13**(1):513-609.
177. Kovoov A, Nappey V, Kieffer BL, Chavkin C. μ and delta Opioid Receptors Are Differentially Desensitized by the Coexpression of beta -Adrenergic Receptor Kinase 2 and beta -Arrestin 2 in Xenopus Oocytes. *J. Biol. Chem.* 1997;**272**(44):27605-27611.
178. Pei G, Kieffer BL, Lefkowitz RJ, Freedman NJ. Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-

coupled receptor kinases but not protein kinase C. *Mol Pharmacol* 1995;**48**(2):173-177.

179. Zhang L, Yu Y, Mackin S, Weight FF, Uhl GR, Wang JB. Differential μ Opiate Receptor Phosphorylation and Desensitization Induced by Agonists and Phorbol Esters. *J. Biol. Chem.* 1996;**271**(19):11449-11454.

180. Qiu Y, Loh HH, Law P-Y. Phosphorylation of the $\{\delta\}$ -Opioid Receptor Regulates Its β -Arrestins Selectivity and Subsequent Receptor Internalization and Adenylyl Cyclase Desensitization. *J. Biol. Chem.* 2007;**282**(31):22315-22323.

181. Shapira M, Keren O, Gafni M, Sarne Y. Divers pathways mediate delta-opioid receptor down regulation within the same cell. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;**96**(1-2):142-50.

182. Chao C, Ives KL, Goluszko E, et al. Src Regulates Constitutive Internalization and Rapid Resensitization of a Cholecystokinin 2 Receptor Splice Variant. *J. Biol. Chem.* 2005;**280**(39):33368-33373.

183. Paing MM, Johnston CA, Siderovski DP, Trejo J. Clathrin Adaptor AP2 Regulates Thrombin Receptor Constitutive Internalization and Endothelial Cell Resensitization. *Mol. Cell. Biol.* 2006;**26**(8):3231-3242.

7. ANNEXES

Deux articles, dont je suis co-auteur, sont joints aux prochaines pages à titre de référence seulement. Le premier intitulé *Internalization and Src activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligands* est paru dans la revue JBC en mars 2005. Le second intitulé *Src promotes delta opioid receptor (DOR) desensitization by interfering with receptor recycling* est paru en ligne (pour l'instant) dans la revue *Journal of cellular and molecular medicine*.

Internalization and Src Activity Regulate the Time Course of ERK Activation by Delta Opioid Receptor Ligands*

Received for publication, October 14, 2004, and in revised form, December 2, 2004
Published, JBC Papers in Press, January 6, 2005, DOI 10.1074/jbc.M411695200

Nicolas Audet[‡], Mélanie Paquin-Gobeil[§], Olivier Landry-Paquet[¶], Peter W. Schiller^{||},
and Graciela Piñeyro^{‡*§¶}

From the [‡]Département de Pharmacologie, the [¶]Département de Biochimie, and the ^{**}Département de Psychiatrie, Faculté de Médecine and the ^{||}Institut des Recherches Cliniques de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Québec H1N3V2, Canada

The present study showed that delta opioid receptor (δ OR) ligands Tyr-Ticpsi [$\text{CH}_2\text{-NH}$]Cha-Phe-OH (TICP) and ICI174864 behaved as inverse agonists in the cyclase pathway but induced agonist responses in the ERK cascade. Unlike ligands that behaved as agonists in both pathways, and whose stimulation of ERK was marked but transient (10 min), ERK activation by ICI174864 and TICP was moderate and sustained, lasting for more than 1 h in the case of TICP. Biochemical experiments showed that duration of ERK activation by agonists and “dual efficacy ligands” was inversely correlated with their ability to trigger receptor phosphorylation and degradation. Thus, although TICP stabilized δ ORs in a conformation that did not incorporate ^{32}P , was not a substrate for tyrosine kinase Src, and was not down-regulated following prolonged exposure to the drug, the conformation stabilized by D-Pen-2,5-enkephalin (DPDPE) incorporated ^{32}P , was phosphorylated by Src, and suffered degradation within the first 2 h of treatment. Inhibition of endocytosis by sucrose prolonged ERK activation by DPDPE increasing the decay half-life of the response to values that resembled those of dual efficacy ligands (from a 2-min decay $t_{1/2}$ increased to 12 min). Src inhibitor PP2 also prolonged ERK stimulation by DPDPE. It did so by maintaining a sustained activation of the kinase at ~20% of maximum following an initial rapid reduction in the response. These results show that specific kinetics of ERK activation by agonists and dual efficacy ligands are determined, at least in part, by the differential ability of the two types of drugs to trigger mechanisms regulating δ OR responsiveness.

Occupation of G protein-coupled receptors by agonist ligands has two distinct consequences, the generation of an intracellular signal and the concomitant activation of a series of regulatory mechanisms that modulate receptor responsiveness over time. The chain of regulatory events triggered by agonist occupation of the receptor has been extensively characterized and has led to an established model of desensitization in which

phosphorylation of the receptor by G protein-coupled receptor kinases is the first step in the process (1, 2). Phosphorylation then promotes the recruitment of β arrestin (3, 4), which is responsible for uncoupling the receptor from the G protein (5) and for its targeting to clathrin-coated pits. From there receptors will be removed from the cell surface via dynamin-dependent endocytosis (6). Once inside the cell the receptor is either degraded or is quickly redirected to the cell membrane (7) for a new signaling cycle.

Despite the overwhelming evidence supporting this tightly knit model of activation and desensitization, there are also increasing observations indicating that activation and regulatory phenomena can be dissociated. For example, antagonist ligands for cholecystokinin (8) and endothelin receptors (9) selectively induce internalization without causing neither receptor activation nor phosphorylation. Agonists for parathyroid hormone type 1 receptor stabilize an active state that promotes signaling but does not recruit β arrestin or induce internalization (10). In contrast, certain β_2 -adrenergic receptor ($\beta_{2\text{AR}}$)¹ ligands that preclude G protein activation are still able to recruit β arrestin to the receptor (11).

Ligands that stabilize G protein-coupled receptors in a conformation that prevents activation of the G protein are classified as inverse agonists and are commonly thought to induce an inactive conformation of the receptor (12, 13). More recently, some of these drugs have been described as “proteans” or “dual efficacy ligands,” referring to their ability to display both agonist and inverse agonist behavior (11, 14–16). For example, we have recently shown that ICI118551 and propranolol, two ligands of the $\beta_{2\text{AR}}$, display dual efficacy, because they behave as inverse agonists in the cyclase pathway but produce agonist responses in the ERK cascade (11).

The observation that some “inverse agonists” may produce agonist responses indicates that the conformation they stabilize is not inactive, but rather a signaling state that is distinct from the one stabilized by classic agonists. If receptor states stabilized by agonists and dual efficacy ligands are distinct, then one would expect that the responses that they elicit would also be regulated in a distinct manner. The present study focused on this question, assessing whether agonistic responses generated by dual efficacy ligands for the δ OR are regulated as agonist responses induced by its classic agonists. Results show

* This work was supported in part by Grant MOP-57910 from the Canadian Institutes of Health Research and a grant from Fonds de Recherche en Santé de Québec (FRSQ). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Holds a studentship from FRSQ.

¶ Recipient of a fellowship for young researchers from FRSQ. To whom correspondence should be addressed: Dépt. de Psychiatrie, Université de Montréal, 7331 Rue Hochelaga, Montréal, Qc H1N3V2, Canada. Tel.: 514-251-4015; Fax: 514-251-2617; E-mail: graciela.pineyro@crf.umontreal.ca.

¹ The abbreviations used are: $\beta_{2\text{AR}}$, β_2 -adrenergic receptor; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; δ OR, delta opioid receptor; DPDPE, D-Pen-2,5-enkephalin; ERK, extracellular signal-regulated kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PP2, 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(4-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine; PTX, pertussis toxin; TICP, Tyr-Ticpsi [$\text{CH}_2\text{-NH}$]Cha-Phe-OH; GTP γ S, guanosine 5'-O-(thiotriphosphate); ANOVA, analysis of variance; TIPP, H-Tyr-TicPsi-[CH₂NH]Phe-Phe-OH.

that ERK activation by dual efficacy ligands like TICP and ICI174864 was considerably longer, although more modest than the response induced by agonists such as SNC-80 and DPDPE. Differences in time course were associated with the distinct ability of dual efficacy ligands to stabilize δ ORs in an ERK-stimulating conformation that eluded regulatory steps typically triggered by highly efficacious agonists.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents.—Buffer chemicals, protease inhibitors, DPDPE, morphine, naloxone, forskolin, isobutylmethylxanthine, PTX, sucrose, anti-FLAG M2 affinity resin, and FLAG peptide were purchased from Sigma. [35 S]GTP γ S, [3 H]adenosine, and [32 P]orthophosphoric acid were from PerkinElmer Life Sciences. ICI174864 and SNC-80 were obtained from Tocris Cookson, TIPP and TICP ψ were synthesized as described previously (17). 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine (PP2) was from Calbiochem. G418, DMEM, fetal bovine serum, fungizone, glutamine, penicillin, and streptomycin were purchased from Wisent.

DNA Constructs.—The human δ OR cDNA was subcloned into the pcDNA3 expression vector (Invitrogen) as described previously (18) and was tagged at the C-terminal end using Clontech site-directed mutagenesis kit to remove the stop codon and introduce the sequence coding for the FLAG epitope (DYKDDDDK). The construction was confirmed by restriction enzyme mapping and DNA sequencing, and its signaling properties were shown to be identical to those of the wild type δ OR (19, 20). A truncated mutant of the murine δ OR (δ OR344T) was kindly provided by Dr. M. von Zastrow (University of California at San Francisco). Wild type and inhibitory mutant forms of c-Src (K295R/Y527F) were a gift from Dr. Bouvier's laboratory (Université de Montréal).

Cell Culture and Transfection.—HEK293s cells were transfected using the calcium-phosphate precipitation method and clones stably expressing full-length or truncated receptors were selected using 400 μ g/ml G418. Cell lines stably expressing full-length δ ORs and wild type c-Src were similarly selected, following Lipofectamine transfection (Invitrogen). The dominant inhibitory form of c-Src (K295R/Y527F) was transiently transfected (0.25–3 μ g of DNA) onto cell lines expressing the full-length δ OR using polyethyleneimine as described previously (21). Cells were grown and maintained in complete DMEM containing 10% (v/v) fetal bovine serum, 1000 units/ml penicillin, 1 mg/ml streptomycin, and 1.5 μ g/ml fungizone in a humidified atmosphere of 5% CO $_2$ at 37 °C.

Phosphorylation and Immunoprecipitation of FLAG-tagged Receptors.—For 32 P incorporation assays, cells were incubated for 2 h in phosphate-free DMEM, after which [32 P]orthophosphoric acid was added at a final concentration of 1 mCi/ml, and incubation was allowed to proceed for an additional hour. At this time, DPDPE (1 μ M), TICP (1 μ M), or vehicle (0.01% Me $_2$ SO) were added to the incubation medium for 30 min. Cells were then recovered, and membranes were prepared as indicated below and finally suspended in solubilization buffer (0.5% *n*-dodecyl-maltoside (w/v), 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 140 mM NaCl, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 10 μ g/ml benzamide, 2 μ g/ml aprotinin, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 2 mM 1,10-phenanthroline). Following agitation at 4 °C for 60 min, the solubilized fraction was centrifuged at 12,000 \times *g* for 60 min, and the receptor was immunoprecipitated from the supernatant fraction using anti-FLAG M2 antibody resin. 40 μ l of antibody-coupled resin equilibrated in solubilization buffer and supplemented with 0.1% bovine serum albumin (w/v) were used to purify the receptor overnight at 4 °C under gentle agitation. The next morning the resin was pelleted, washed twice with 500 μ l of solubilization buffer and four times with 500 μ l of modified solubilization buffer (containing 0.1% instead of 0.5% *n*-dodecyl-maltoside (w/v)). The receptor was then eluted by incubating the resin for 10 min at 4 °C with 100 μ l of modified solubilization buffer containing 175 μ g of FLAG peptide/ml. This elution was repeated three times, and the eluates were combined and concentrated by membrane filtration over Microcon-30 concentrators (Millipore). SDS sample buffer was then added, and samples were used for SDS-PAGE. A similar immunoprecipitation procedure was used to assess Tyr phosphorylation of δ ORs.

SDS-PAGE and Western Blotting.—SDS-PAGE was performed as described by Laemmli using a 4% stacking gel and 10% separating gel. Proteins resolved in SDS-PAGE were then transferred (50 mA, 16 h, Bio-Rad Mini-Trans Blot apparatus) from the gels onto nitrocellulose (Amersham Biosciences). In the case of 32 P incorporation studies, membranes were first exposed for autoradiography (BIOMAX films, Eastman Kodak Co.). When assessing Tyr phosphorylation of δ ORs, mem-

branes were probed overnight at 4 °C with monoclonal antibodies raised against phosphorylated Tyr (1:500, PY99, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). In both cases antisera directed against the FLAG M2 antibody (1:1000, Sigma) were used to detect the total amount of receptor protein present in each sample. Horseradish peroxidase-conjugated antimouse secondary antibodies (1:4000, Sigma) and chemiluminescence detection reagents (PerkinElmer Life Sciences) were used to reveal the blotted proteins, and relative intensities of the labeled bands were analyzed by densitometric scanning using MCID (Imaging Research Inc). Receptor phosphorylation was expressed as the ratio between phosphorylation and FLAG signals to normalize to the amount of receptor protein present in each sample.

For detection of ERK1/2 activation, cells were grown in 6-well plates and serum-starved overnight. The day of the experiment they were cultured for 2 h in serum-free medium and then exposed to different ligands. Following treatment, cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline, and whole cell extracts were prepared by lysis in SDS sample buffer. Samples were sonicated and then boiled for 5 min before loading for SDS-PAGE. Phospho-ERK1/2 detection was done by probing membranes with antiphospho-ERK1/2 antibody (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology). Total ERK protein was determined after stripping by using 1:20,000 dilution anti-ERK1/2 antibody (Santa Cruz Biotechnology). Secondary antimouse (1:5,000, Sigma) and antirabbit (1:40,000, Amersham Biosciences) horseradish-conjugated antibodies were used to visualize proteins by chemiluminescence. ERK1/2 phosphorylation was normalized according to protein contents by expressing results as the ratio between pERK1/2 and total ERK1/2.

To assess Src activation, cells were grown in 100-mm Petri dishes and prepared for the experiment as described for ERK1/2. Following treatment with different ligands cells were washed, harvested, and solubilized in precipitation assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.25% deoxycholate acid, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 10 μ g/ml benzamide, 1 μ g/ml aprotinin, 1 mM Na $_3$ VO $_4$) at 4 °C for 90 min. After centrifugation of non-solubilized debris at 12,000 \times *g* for 20 min samples were concentrated, suspended in SDS sample buffer, and separated in SDS-PAGE. Anti-phospho-Src (Y416) monoclonal antibody (Upstate Biotechnology Inc.) at a dilution of 1:1000 was used to determine the presence of activated Src and total amount of protein loaded was detected by probing with antibody anti-Src (1:250, Upstate Biotechnology Inc.).

cAMP Accumulation Assays.—Cells were labeled overnight (16 h) with 1 μ Ci/ml of [3 H]adenine in complete DMEM medium. The day of the experiment radioactive medium was replaced with fresh DMEM, cells were mechanically detached and thoroughly washed (three times) with phosphate-buffered saline (4 °C), and viability was assessed using trypan blue (mortality was never higher than 5%). 5×10^6 cells were then incubated for 20 min at 37 °C in 300 μ l of assay mixture containing phosphate-buffered saline, 25 μ M forskolin, 2.5 μ M isobutylmethylxanthine, and different drugs at the indicated concentrations. At the end of the incubation period, the assay was terminated by adding 600 μ l of ice-cold solution containing 5% trichloroacetic acid, 5 mM ATP, and 5 mM cAMP. [3 H]ATP and [3 H]cAMP were separated by sequential chromatography on Dowex exchange resin and aluminum oxide columns. Results were expressed as the ratio of [3 H]cAMP/[3 H]ATP plus [3 H]cAMP.

[35 S]GTP γ S binding assays were carried out on whole cell membrane preparations as described previously (20). Cells were suspended in lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl $_2$, 2 mM EDTA, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, and 10 μ g/ml benzamide) and homogenized with a Polytron homogenizer (Ultra-Turrax T-25, Janke and Kunkel) using three bursts of 5 s at maximum setting. Homogenates were centrifuged at 700 \times *g* for 5 min, and the supernatant was further centrifuged at 27,000 \times *g* for 20 min. Pellets were washed twice in lysis buffer and were immediately resuspended in [35 S]GTP γ S assay buffer (50 mM Hepes, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl $_2$, 1 mM dithiothreitol, 0.5% bovine serum albumin, and 3 μ M GDP, pH 7.4) to yield 10 μ g of protein/tube. [35 S]GTP γ S was used at 50 nM, and nonspecific binding was determined in the presence of 100 μ M GTP. The test compound SNC-80 was introduced at a final concentration of 100 nM and incubation was allowed to proceed for one hour at RT. The reaction was terminated by rapid filtration onto Whatman GF/C glass filters pre-soaked in water. Filters were washed twice with ice-cold wash buffer (pH 7) containing 50 mM Tris, 5 mM MgCl $_2$, and 50 mM NaCl, and the radioactivity retained was determined by liquid scintillation.

Data Analysis.—Statistical analysis and curve fitting were done using Prism 2.01 (GraphPad, San Diego, CA).

RESULTS

Comparison of the Effects of δ OR Ligands in cAMP and ERK Signaling Cascades—It has been previously shown that certain ligands for β_{2AR} display dual efficacy, inducing inverse agonist responses in the cAMP signaling pathway, but producing agonist effects in the ERK cascade (11). To determine whether this type of dual behavior was specific to G_{α_s} -coupled receptors or could be extended to receptors coupled to $G_{\alpha_{12}}$ proteins, different ligands for the δ OR were compared in adenylyl cyclase and ERK signaling pathways. In the cAMP pathway ligands produced effects that spanned the complete spectrum of efficacy ranging from agonism to inverse agonism. At maximally effective concentrations (1 μ M) SNC-80 and DPDPE were highly efficacious agonists, morphine, TIPP, and naloxone were partial agonists, while ICI174864 and TICIP displayed typical inverse agonist responses. Fig. 1A shows these different ligands ranked according to magnitude and vectorial aspects of their efficacies (SNC-80 \geq DPDPE $>$ MOR \geq TIPP \geq Nx $>$ ICI174864 $>$ TICIP). In contrast with the diversity of responses observed in cAMP accumulation assays all drugs tested in the ERK cascade behaved as agonists, except for naloxone that was neutral. Indeed, ERK phosphorylation was induced not only by drugs that behaved as agonists in the cyclase cascade but also by TICIP and ICI174864, which had produced inverse agonist responses when tested in this pathway. Moreover, when ranked according to the magnitude of their effect on ERK phosphorylation, TICIP, the most efficacious inverse agonist in the cyclase pathway was now more effective than partial agonists TIPP and morphine in activating ERK (SNC-80 $>$ DPDPE $>$ TICIP \geq TIPP \geq ICI174864 \geq MOR $>$ Nx).

Dual efficacy ligands for the β_{2AR} produce ERK activation via β arrestin recruitment and independently of G protein activity (11). To determine whether this was also the case for $G_{\alpha_{12}}$ -coupled receptors, cells were treated overnight with PTX, and ERK activity was assessed the following day. Without modifying basal activity of the kinase (pERK/ERK_{total} ratio in controls: 0.6 ± 0.1 ; following PTX: 0.6 ± 0.1), PTX abolished ERK stimulation by classic agonist DPDPE and by dual efficacy ligand TICIP (Fig. 1C). These results indicate not only that ERK stimulation by DPDPE and TICIP requires $G_{\alpha_{12}}$ protein activity but also that simple inactivation of spontaneous $G_{\alpha_{12}}$ signaling cannot account for ERK stimulation. Neither TICIP, ICI174864, nor classic agonists were able to evoke ERK activation in non-transfected cells (not shown), confirming that ligand-induced stimulation of ERK signaling was specifically mediated by the δ OR.

δ OR Ligands Differ in Their Kinetics of ERK Activation—To determine whether the time course of ERK activation by classic agonists differed from that of dual efficacy ligands, cells were exposed to a maximally effective concentration (1 μ M) of each drug, and ERK phosphorylation was measured following increasing periods of time. Two main types of kinetic profiles could be recognized. One was characteristic of highly efficacious ligands like SNC-80 and DPDPE, which produced quick and pronounced ERK activation that peaked within 5 min (Fig. 2A), decaying right away with a calculated half-life ($t_{1/2}$) of ~2 min (Fig. 2, B and C). The other type of response, induced by partial agonists and dual efficacy ligands was less pronounced but more sustained, decaying with a $t_{1/2}$ that ranged between 11 and 14 min (Fig. 2, B and C). Among ligands inducing sustained responses, the effect of TICIP could be distinguished from the rest of the drugs in the same category, because its effect was more pronounced and particularly more sustained ($p < 0.001$ two-way ANOVA; Fig. 2, A and B).

The Time Course of ERK Activation by Highly Efficacious Agonists and Dual Efficacy Ligands Is Correlated with Desensitization Parameters—One of the primary checkpoints that

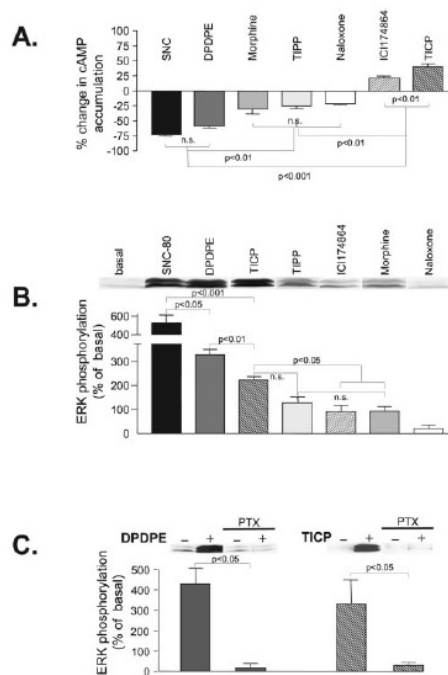


FIG. 1. Comparison of the efficacy of δ OR ligands in adenylyl cyclase and ERK cascades. A, HEK293s cells stably expressing full-length δ ORs (1–1.5 pmol/mg of protein) were treated with saturating concentrations (1 μ M) of the indicated ligands and cAMP accumulation assays performed in presence of 25 μ M forskolin as detailed under "Experimental Procedures." Statistical significance of drug effects on cAMP production was established by comparing the amount of cAMP counts obtained in the presence of each ligand to cAMP counts produced in the control situation (all drugs differed from control as determined using one-way ANOVA and Dunnett's post hoc test; $p < 0.05$; not shown). Drug effects as they appear in the figure are expressed as percent change with respect to total amount of cAMP produced in the absence of ligand (percent change in cAMP accumulation = $[(cAMP_{ligand} - cAMP_{no\ ligand})/cAMP_{no\ ligand}] \times 100$) and correspond to mean \pm S.E. of at least nine experiments carried out in triplicates. Differences among drug effects were established by comparing percent changes induced by different ligands using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test. B, HEK293 cells stably expressing full-length δ ORs were serum-starved (16 h) prior to exposure to saturating concentrations (1 μ M) of the indicated ligands for 5 min following which ERK signaling was assessed by immunoblot. Band immunoreactivity was quantified using MCID to measure optical density, and ERK1/2 phosphorylation was normalized to the amount of protein loaded per lane, by expressing the data as a ratio of phosphoERK1/2 over total ERK1/2 optical density. The statistical significance of drug effects was established by comparing the ratio obtained in the presence of each ligand to the ratio obtained in the basal condition (all drugs except naloxone differed from basal using one-way ANOVA and post hoc Dunnett's test; $p < 0.05$; not shown). Drug effects as they appear in the figure were expressed as the percentage of the basal ratio (percentage of basal = $[(pERK/totalERK)_{ligand}/(pERK/totalERK)_{basal}] \times 100$), and represent mean \pm S.E. of at least seven experiments. Statistical differences that appear in the figure were established using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Immunoblots above the histogram bars correspond to representative examples of results obtained for each of the indicated drugs. C, effect of PTX (100 ng/ml for 16 h) on DPDPE or TICIP-induced ERK phosphorylation. Cells were serum-starved and exposed or not to PTX prior to treatment with either DPDPE or TICIP (1 μ M for 5 min). Results, expressed as in B, correspond to mean \pm S.E. of four independent experiments. Statistical difference between drug effects obtained in the presence and absence of PTX was determined using Student's t test and appear in the figure.

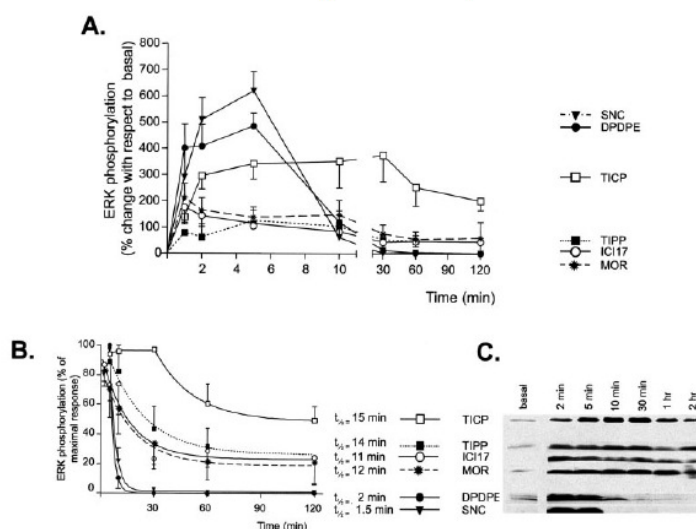


FIG. 2. δ OR ligands differ in their kinetics of ERK activation. HEK293s cells stably expressing full-length δ ORs were serum-starved (16 h) prior to exposure to saturating concentrations (1 μ M) of different ligands for the indicated times, and phosphoERK1/2 immunoreactivity measured as before. **A**, time course of ERK activation by different ligands. Results represent mean \pm S.E. of at least three experiments and are expressed as percentage of basal as in Fig. 1B. **B**, decay of ERK responses represented in **A**. Results are expressed as the percentage of maximal response observed with each drug. Curves were fit to one phase exponential decay using GraphPad Prism 2.01 and compared by to one-way ANOVA to generate statistics discussed in the text. Calculated $t_{1/2}$ values appear in the figure. **C**, representative immunoblots of phosphorylated ERK1/2 bands obtained with indicated ligands at different time points.

controls drug effects over time is the receptor itself. In particular, δ OR signaling efficacy is regulated by phosphorylation of C-terminal Ser/Thr residues (22, 23). To determine whether differences in the time course of ERK activation could be related to the distinct ability of different ligands to trigger phosphorylation of δ ORs cells were exposed for 30 min to DPDPE or TICP (1 μ M) in the presence of [32 P]orthophosphoric acid. Receptors were immunopurified, resolved on SDS-PAGE, and transferred onto nitrocellulose membranes that were first exposed for autoradiography and then used for Western blot analysis using an anti-FLAG M2 antibody. Immunoblots revealed two broad bands at ≈ 55 and ≈ 46 kDa, corresponding to mature and immature monomeric forms of the receptor, respectively (24). Autoradiograms showed that 30-min incubation with DPDPE increased 32 P incorporation by the ≈ 55 -kDa species, but this effect was absent for TICP. Thus, at a time when the ERK response for the agonist was no longer present, δ ORs were heavily phosphorylated. In contrast, ERK activation by the dual efficacy ligand was still at its maximum, and no phosphorylation of the receptor could be detected.

Phosphorylation is an initial step in the process of desensitization, but if exposure to an agonist is allowed to proceed long enough, δ ORs will start to be targeted for degradation (7). Hence, to confirm whether the different time course of ERK activation by DPDPE and TICP also correlated with later events in the process of desensitization, cells were treated for 2 h either with the agonist or the dual efficacy drug. Following treatment the total amount of δ OR protein present in membrane preparations was assessed by immunoblot (Fig. 3B). Although incubation with TICP caused no detectable change in the mature receptor species (≈ 55 kDa), there was a decrease of the corresponding immunoreactive band following treatment with DPDPE. These results confirm that differences in the time

course of ERK activation by DPDPE and TICP is inversely correlated with the ability of each ligand to trigger different events within the process of desensitization.

If indeed differences in time course of ERK activation by agonists and dual efficacy ligands were due to their distinct ability to trigger regulatory mechanisms of receptor responsiveness, interfering with these mechanisms should transform ERK activation by the agonist, into the more prolonged type of response observed for the dual efficacy ligand. To test this assumption the time course of ERK activation by DPDPE was assessed in presence of sucrose, which is an inhibitor of clathrin-mediated endocytosis. Although sucrose did not turn ERK activation into a stable response, it prolonged the effect of DPDPE by increasing the decay $t_{1/2}$ of activation from 2 to 12 min ($p < 0.001$ for interaction; two-way ANOVA; Fig. 4), a value that falls within the 11- to 15-min range observed for dual efficacy ligands. Another means to modify mechanisms regulating δ OR responsiveness is to mutate amino acids that are implicated in the process. For δ ORs, Ser/Thr residues located in the C-terminal domain of the receptor are the principal target for G protein-coupled receptor kinases, and their phosphorylation is an essential step in the desensitization of full-length δ ORs (22, 23, 25). To explore the contribution of these residues to the kinetics of ERK activation by DPDPE, experiments were repeated using a receptor truncated at its C terminus (δ OR344T). This approach also yielded results in which the DPDPE response decayed more slowly than in the full-length receptor ($t_{1/2}$ of 6 min; two-way ANOVA; $p < 0.01$ for interaction; Fig. 4). However, the effect of truncation was far less noticeable than that observed with sucrose on the full-length δ OR. Moreover, the addition of sucrose further prolonged the decay $t_{1/2}$ for DPDPE in truncated receptors ($t_{1/2}$ of 38 min; two-way ANOVA; $p < 0.02$ for interaction; Fig. 4).

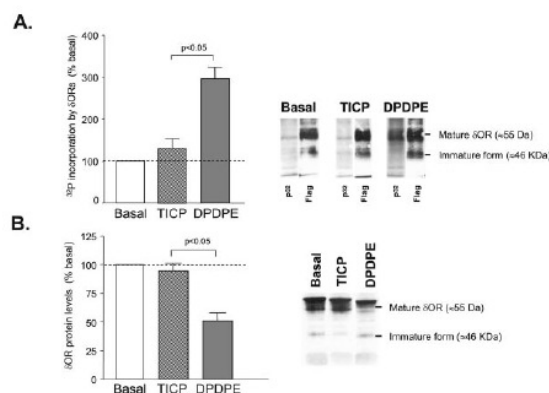
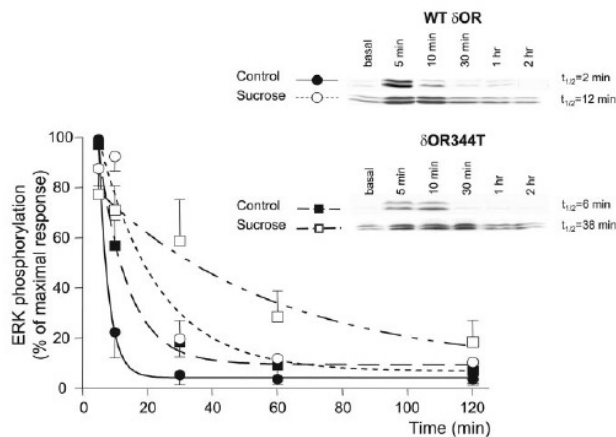


FIG. 3. DPDPE and TICP differ in their ability to induce receptor phosphorylation and down-regulation. *A*, effect of DPDPE and TICP on the phosphorylation of full-length δORs . HEK293s cells stably expressing δORs (1–1.5 pmol/mg of protein) were metabolically labeled with ^{32}P and exposed for 30 min (1 μM) to either of the drugs. The receptor was purified by immunoprecipitation using anti-FLAG M2 antibody resin and subjected to electrophoresis on 10% SDS-PAGE. Representative autoradiograms and corresponding Western blots for different conditions are shown on the right panel. Band immunoreactivity was quantified using MCID, and receptor phosphorylation was normalized to the amount of protein loaded in each lane by expressing data as the phospho/protein ratio calculated from densitometric analysis of the autoradiogram and its corresponding Western blot. Results represent mean \pm S.E. of at least five experiments and are expressed as the percentage of the phospho/protein ratio obtained in the basal condition (percentage of basal = $(\text{phospho} - \text{protein ratio}_{\text{ligand}}) / (\text{phospho} - \text{protein ratio}_{\text{basal}}) \times 100$). Statistical significance of differences between drugs was established using Student's *t* test, and the result of the analysis appears in the figure. *B*, effects of DPDPE and TICP on receptor protein contents. Immunoblots of FLAG-tagged δORs were performed on crude membrane preparations derived from cells that had been treated or not for 2 h with 1 μM of the indicated drug. Identical amounts of membrane proteins were loaded for each condition (100 μg /well), and the total amount of receptor protein was estimated by densitometric analysis of the mature monomeric band. Results represent mean \pm S.E. of four experiments and are expressed as the percentage of densitometric values obtained in basal conditions (percentage of basal = $(\text{densitometric values}_{\text{ligand}}) / (\text{densitometric values}_{\text{basal}}) \times 100$). Statistical significance of differences between drugs was established using Student's *t* test, and the result of the analysis appears in the figure.

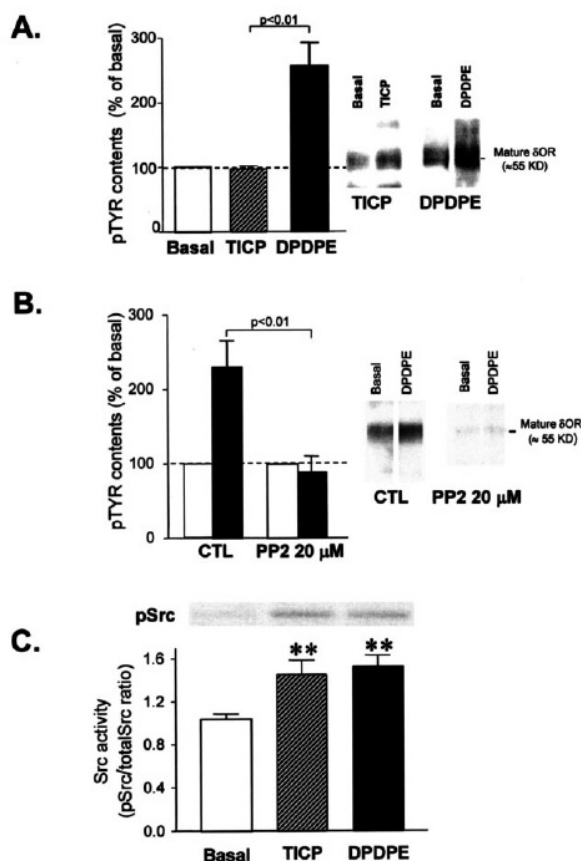
FIG. 4. ERK activation by DPDPE may be modified to yield a prolonged decay $t_{1/2}$ typical of TICP. HEK293 cells stably expressing wild type or truncated δORs (0.5–1 pmol/mg of protein) were serum-starved (16 h) and on the day of the experiment were incubated or not with 0.4 M sucrose for 4 h, followed by exposure to saturating concentrations (1 μM) of DPDPE for the indicated times. PhosphoERK1/2 immunoreactivity was measured as described in previous figures. Results are expressed as percentage of maximal response and correspond to mean \pm S.E. of at least seven experiments. Curves were fit to one-phase exponential decay using GraphPad Prism 2.01 and calculated $t_{1/2}$ values appear in the figure to the right of representative immunoblots obtained for each condition. Statistical comparison among curves was done using two-way ANOVA, and *p* values are discussed in the text.



Agonists but Not Dual Efficacy Drugs Induce Tyr Phosphorylation of δORs —The fact that the time course of ERK activation by DPDPE was only modestly prolonged by removal of the C terminus suggests that there could be a complementary mechanism capable of regulating ERK activation by agonists in the absence of C-terminal Ser/Thr residues. In this sense mutation of a Tyr residue located proximal to Ser/Thr amino acids of the C terminus has been shown to attenuate agonist-induced internalization and down-regulation of the receptor (26). Thus, it was deemed of interest to determine whether δORs could be

differentially phosphorylated at their tyrosine residues following exposure to agonists and dual efficacy ligands. To do so, cells expressing full-length receptors were incubated for 30 min either with DPDPE or TICP, and receptors were immunopurified and separated by SDS-PAGE. Immunoblots with antibodies that recognize phosphorylated Tyr residues showed that TICP and DPDPE distinctively modified phospho-Tyr contents of δORs (Fig. 5A). Although 30-min incubation with TICP (1 μM) produced no significant change, DPDPE induced an increase in immunoreactivity for phospho-Tyr in the band corre-

FIG. 5. Tyrosine kinase Src phosphorylates δ ORs occupied by DPDPE but not by TICIP. A, HEK293s cells stably expressing FLAG-tagged δ ORs were exposed for 30 min to either of the drugs, and the receptor purified as described before. Tyrosine phosphorylation was assessed by immunoblot by calculating the ratio between phospho-Tyr immunoreactivity of the mature species (shown in the right panel) and FLAG immunoreactivity of the same band (not shown). Results represent mean \pm S.E. of at least five experiments and are expressed as percentage of the ratio between phospho-Tyr immunoreactivity and FLAG immunoreactivity obtained in basals. Statistical significance of differences between the two drugs was established using Student's *t* test, and the result of the analysis appears in the figure. B, 20 μ M PP2 or vehicle (Me₂SO 0.01%) were introduced to cell cultures 1 h before the experiment followed by stimulation by DPDPE (1 μ M for 30 min) and assessment of pTyr immunoreactivity in purified receptors. Results are expressed as the percentage of the of phospho-Tyr/FLAG ratio obtained in basals of the corresponding control or PP2 condition and represent mean \pm S.E. of at least five experiments. Student's *t* test was used to compare phosphorylation induced in the presence and absence of the Src blocker. The result of the analysis appears in the figure. C, effects of DPDPE and TICIP on Src activity. Cells were serum-starved overnight (16 h) and then exposed to the indicated drug (1 μ M) for 5 min. Src activation was assessed as described under "Experimental Procedures" by measuring phospho-Tyr⁴¹⁶ immunoreactivity. Src phosphorylation was normalized according to the amount of protein present in each sample by expressing the data as a ratio of phospho-Tyr⁴¹⁶ over total Src immunoreactivity. Results represent mean \pm S.E. of seven experiments and are expressed as pSrc/totalSrc ratio. Statistical significance of drug effects was determined using one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test to compare drugs to basal. **, *p* < 0.01.



sponding to the mature receptor (Fig. 5A). Furthermore, the introduction of Src inhibitor PP2 (20 μ M) prior to exposure to DPDPE prevented the increase in phospho-Tyr content (Fig. 5B), indicating that a non-receptor Tyr-kinase of the Src family was involved in agonist-induced Tyr phosphorylation of δ ORs. To determine whether failure of TICIP to induce Tyr phosphorylation of the receptor was due to its incapacity to stimulate Src, cells overexpressing the kinase were exposed either to DPDPE or TICIP and changes in Src activity assessed by immunoblot. Fig. 5C shows that both the agonist and the dual efficacy ligand increased immunoreactivity for the active form of Src, confirming that the observed difference in tyrosine phosphorylation of δ ORs was not related to diminished capacity of TICIP to stimulate Src.

The goal of the next series of experiments was to assess whether Src could differentially regulate ERK responses generated by DPDPE or TICIP. To accomplish this, cells were pretreated with increasing concentrations of Src inhibitor PP2, and ERK stimulation was assessed following exposure to each of the two δ OR ligands. It was found that concentrations of 20–40 μ M PP2 had opposite effects on ERK activation by the dual efficacy ligand and the agonist. Although the effect of TICIP was blocked (Fig. 6A), that of DPDPE was enhanced, and

it was only at a concentration of 80 μ M that PP2 interfered with ERK activation by DPDPE (Fig. 6B). The inhibitory effect of low, specific concentrations of PP2 on the response to TICIP is compatible with the notion that this drug induces ERK activation in a Src-dependent manner. On the other hand, the higher nonspecific concentrations needed to block the effect of DPDPE do not allow us to conclusively implicate Src as an intermediate in agonist-induced ERK stimulation. So, to overcome this problem of specificity, ERK activation by DPDPE was re-assessed by transfecting cells with increasing concentrations of a kinase-impaired Src mutant (K296R/Y528F). This procedure generated a similar biphasic pattern as described for PP2, with low levels of the mutant (0.25–0.5 μ g of DNA) enhancing DPDPE responses and higher levels (3 μ g of DNA) inhibiting ERK activation by the agonist. The observed inhibition of DPDPE responses by high levels of inactive Src confirms the idea that activity of this kinase is necessary for ERK activation by agonists and is consistent with previous reports showing that pharmacological inhibition of Src interfered with agonist-induced ERK activation (27).

On the other hand, the fact that low levels of mutant Src or modest concentrations of PP2 enhanced ERK activation by

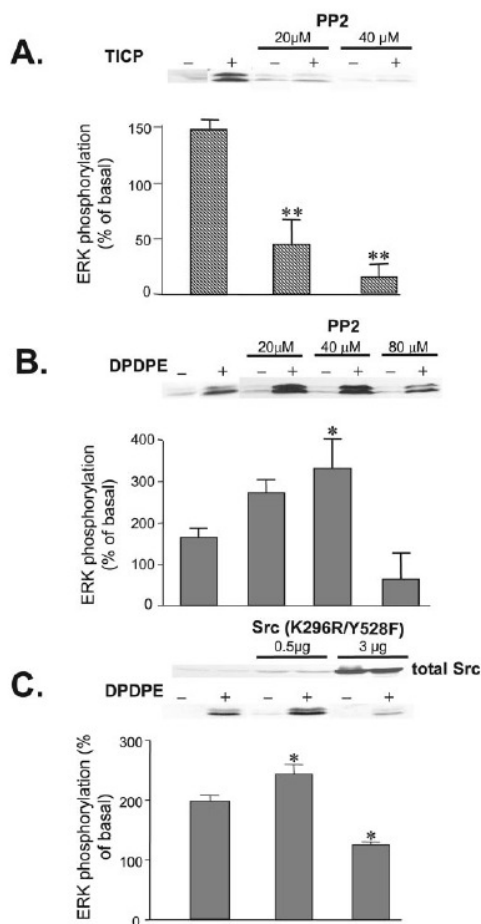


FIG. 6. Src inhibitor PP2 produced opposite effects on ERK activation by DPDPE and TICIP. HEK293s cells stably expressing full-length δ ORs (0.5–1 pmol/mg of protein) were serum-starved overnight (16 h) and the day of the experiment exposed to indicated concentration of PP2 or vehicle (Me₂SO, 0.01%) 1 h before addition of TICIP (A) or DPDPE (B) (1 μ M for 5 min). PhosphoERK1/2 immunoreactivity was measured as described before and expressed as the percent change of phosphoERK/ERK_{total} ratio obtained in the absence of δ OR ligand. Results represent mean \pm S.E. of at least four experiments. Statistical significance of the effect of PP2 on DPDPE and TICIP responses was established using one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test to compare ERK activation in the absence of PP2 to activation induced in presence of increasing concentrations of the Src inhibitor. *, $p < 0.05$. C, HEK293s cells stably expressing full-length δ ORs were transiently transfected with the indicated concentrations of DNA encoding for kinase-impaired Src mutant (K296R/Y528F). Results and statistical analysis are as in B. On top of the representative immunoblots for ERK activity are the blots corresponding to the total amount of Src immunoreactivity present in cell lysates following transfection with the indicated quantities of Src K296R/Y528F.

DPDPE suggest that Src could also be involved in the negative regulation of agonist signaling. This possibility was assessed by pretreating cells with DPDPE (1 μ M for 30 min) in the presence

or absence of PP2 and by then assessing the ability of SNC-80 to induce GTP γ ³⁵S binding. By itself, PP2 (20 μ M for 1 h) enhanced the ability of SNC-80 (100 nM) to promote GTP γ ³⁵S binding (controls: 169 \pm 17 fmol/mg; PP2: 209 \pm 17 fmol/mg; $p < 0.05$; Fig. 7A), but this effect was accompanied by a marked increase in basal nucleotide binding (controls: 86 \pm 9 fmol/mg; PP2: 128 \pm 17 fmol/mg; $p < 0.05$, Fig. 7A). Therefore, to avoid any possible confounding, subsequent comparisons of the ability of SNC-80 to promote GTP γ ³⁵S binding were expressed as percentage changes with respect to the corresponding non-stimulated condition under study. As shown in Fig. 7B, the efficacy of SNC-80 to induce nucleotide binding was greatly reduced following pre-treatment with DPDPE. However, if PP2 was introduced into the incubation medium before DPDPE, the ability of SNC-80 to induce GTP γ ³⁵S binding was not significantly modified, confirming that inhibition of Src activity had a protective effect against agonist-induced desensitization.

Finally, to specifically examine whether Src may have contributed to the distinct kinetic profile of ERK activation by DPDPE and TICIP, the time course for DPDPE was assessed in presence of 20 μ M PP2. In the absence of Src inhibition, ERK phosphorylation by DPDPE had completely disappeared within the first 30 min of incubation. In contrast, in the presence of PP2, ERK activity at 30 min was still 18 \pm 5% of the maximal response (which corresponds approximately to a 95% increase above ERK activity in non-stimulated cells; $p < 0.01$; two-way ANOVA; Fig. 7C). Moreover, PP2 had a stabilizing effect on ERK activation by DPDPE, because following 1-h incubation with the agonist, phosphorylation of the kinase was not significantly changed from the value observed 30 min before (16 \pm 5% of maximal).

DISCUSSION

The present study provides new insight into the regulation of agonistic responses induced by double efficacy ligands. In particular, results presented indicate that when occupied by this type of dual ligands δ ORs elude phosphorylation and induce prolonged activation of the ERK cascade. These properties contrast with those of highly efficacious agonists, whose activation of the ERK cascade is transient and correlated with heavy phosphorylation and degradation of the receptor.

ERK was activated not only by drugs like SNC-80, DPDPE, TIPP, and morphine, which also produced agonistic effects in the cyclase pathway, but also by ligands like TICIP and ICI174864 that stimulated ERK activity despite displaying inverse agonist behavior in cAMP accumulation assays (Fig. 1, A and B). Inverse agonists are commonly thought to produce their actions via an inactive receptor conformation that precludes G protein signaling (12, 13). However, it is improbable that activation of the ERK cascade by TICIP or ICI174864 could be due to inhibition of spontaneous $G_{i/o}$ signaling, because the inactivation of $G_{i/o}$ proteins by PTX failed to produce any effect on ERK activity (Fig. 1C). Moreover, the fact that PTX abolished ERK activation by TICIP indicates that, similar to agonists, ERK activation by dual efficacy δ OR ligands requires the activation of a $G_{i/o}$ protein. This property is in marked contrast with dual efficacy ligands described previously for the β_{2AR} whose activation of the ERK cascade was not dependent on G proteins (11).

The fact that TICIP could stimulate $G_{i/o}$ proteins to activate ERK signaling and simultaneously block $G_{i/o}$ activity regulating the cyclase pathway may be explained by the fact that δ ORs are promiscuous receptors, capable of interacting with more than one $G_{i/o}$ protein subtype (28, 29). Hence, it is possible for ligands like TICIP or ICI174864 to simultaneously display opposite agonist and inverse agonist behaviors in ERK and cAMP cascades by, respectively, stabilizing a conformation of the receptor that activates one $G_{i/o}$ subtype but inactivates another. In contrast, classic agonists would stabilize a conforma-

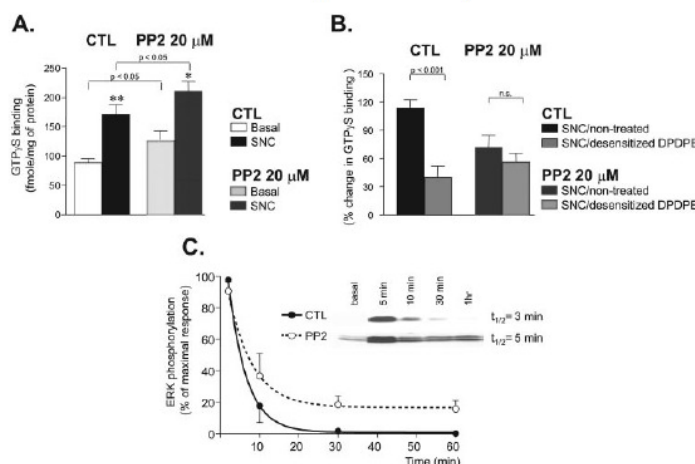


FIG. 7. PP2 protects against desensitization by DPDPE and modifies the time course of ERK activation by this agonist. A, cells were exposed to PP2 (20 μ M) or vehicle (Me₂SO, 0.01%) for 1 h following which membranes were prepared and used to assess GTP γ [S binding. Results are expressed as femtomoles of GTP γ [S bound/mg of membrane protein and represent the mean \pm S.E. of four independent experiments. Statistical differences between different conditions were established using two-way ANOVA; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. B, cells were treated or not with PP2 as in A before adding DPDPE (1 μ M) for additional 30 min. Membranes were then prepared, and SNC-80 effects (100 nM) were assessed in native membranes and in membranes obtained from desensitized cells. Results are expressed as the percent change with respect to basal values obtained in each condition (percent change with respect to basal = $(\text{GTP}\gamma[\text{S}] \text{ bound}_{\text{ligand}} - \text{GTP}\gamma[\text{S}] \text{ bound}_{\text{no ligand}}) / (\text{GTP}\gamma[\text{S}] \text{ bound}_{\text{no ligand}}) \times 100$) and represent the mean \pm S.E. of three independent experiments. Differences in SNC-80 actions among the different conditions were established using two-way ANOVA and results appear in the figure. C, HEK293 cells stably expressing wild type δ ORs were serum-starved (16 h), and the day of the experiment exposed to PP2 (20 μ M) or vehicle (Me₂SO, 0.01%) 1 h before addition of DPDPE (1 μ M) for the indicated times. ERK phosphorylation was measured as described previously, and results are expressed as the percentage of maximal response. They correspond to the mean \pm S.E. of at least four experiments. Curves were fit to one-phase exponential decay using GraphPad Prism 2.01. Calculated $t_{1/2}$ values appear in the figure to the right of representative immunoblots obtained for each condition. Statistical comparison among curves was done using two-way ANOVA and p values are discussed in the text.

tion that activates G α_o proteins responsible for the regulation of both pathways.

Consistent with the idea that classic agonists and dual efficacy ligands may stabilize δ ORs in different conformations is the observation that the rank order of efficacy with which TICIP, TIPP, and morphine modified cyclase signaling was reversed with respect to their efficacies to promote ERK activation (Fig. 1, A and B). In fact, reversal in rank order of efficacy (or potency) for ligands that regulate more than one signaling cascade via the same receptor is considered as one of the most compelling proofs in favor of a model of ligand-specific active receptor states (30, 31). In particular, the observed swap in position between TICIP on the one hand and TIPP and morphine on the other makes it possible to conclude that the conformation via which the dual efficacy ligand stimulated ERK signaling is different from the one(s) involved in ERK stimulation by the two partial agonists.

The observations that receptors stabilized by DPDPE but not those occupied by TICIP incorporated [32 P] (Fig. 3A) and were a target for the tyrosine kinase Src (Fig. 5, A and B), further support the idea that δ ORs may exist in ligand-specific conformations and point to the fact that these different receptor states have distinct desensitization properties. The response observed for DPDPE is in keeping with previous reports showing that highly efficacious agonists promote δ OR phosphorylation by G protein-coupled receptor kinases and tyrosine kinases (23, 25, 27, 32, 33). On the other hand, TICIP resembles morphine in its ability to induce a receptor conformation that is poorly phosphorylated by receptor kinases (32). Although the failure of morphine to trigger phosphorylation of different opioid receptors has been frequently attributed to its stabilization

of a receptor conformation that differs from the one stabilized by more efficacious agonists (34), there is some controversy as to whether lack of receptor phosphorylation is not just the reflection of the low efficacy of the drug (35, 36). Given the fact that DPDPE and TICIP induced similar levels of Src activity (Fig. 5C) differential tyrosine phosphorylation of δ ORs by the two ligands (Fig. 5A) cannot be attributed to drug efficacy, further pointing to the existence of distinct conformations that are differentially recognized as Src substrates. At the same time, similar magnitude of Src activation by TICIP and DPDPE poses the question: why do they differ in their ability to stimulate the MAPK (Fig. 1B)? A possible explanation to this observation would be that DPDPE activates ERK via more than one pathway, whereas TICIP would only depend on Src.

Phosphorylation of Ser/Thr residues in the C-tail of δ ORs is a major regulatory event that triggers the internalization (22, 33) and desensitization (22, 23) of the full-length receptor. Hence, it was reasoned that, if the differential phosphorylation of these residues by TICIP and DPDPE contributed to their distinct kinetics of ERK activation, removal of the C terminus or interference with the process of internalization of the full-length receptor should convey ERK activation by DPDPE some of the characteristics of the TICIP response. Both of these interventions resulted in prolonged ERK stimulation by DPDPE, but only inhibition of internalization by sucrose prolonged the decay $t_{1/2}$ of ERK activity to values within the range observed for dual efficacy ligands. Furthermore, the discrete increase in decay $t_{1/2}$ associated with the effect of DPDPE in the truncated δ OR could be further prolonged by sucrose, indicating that the time course of ERK responses generated by the truncated mutant was still dependent on internalization. The latter obser-

vation, which is consistent with previous studies showing that in HEK293 cells this truncated mutant internalizes as the wild-type (37), stresses the determinant role played by receptor sequestration in the kinetics of ERK stimulation by agonists. On the other hand, the prolonged decay $t_{1/2}$ associated with the stimulation of ERK by dual efficacy ligands (Fig. 2B) is consistent with previous results showing that 30-min exposure to ICI174864 did not change the total amount of δ ORs present at the cell membrane (20).

Although inhibition of internalization slowed down the decay of ERK activity induced by the agonist, the response never attained the characteristic sustained profile observed for ERK activation by TICP (Fig. 2A). This incapacity to recreate the complete "phenotype" of TICP stimulation, together with the fact that DPDPE produced a very transient activation of ERK in the truncated mutant, suggested that mechanisms different from phosphorylation of the C terminus could also contribute to the distinct kinetics of ERK stimulation by DPDPE and TICP.

Because only DPDPE stabilized δ ORs in a conformation that was recognized by Src and given that tyrosine residues have been implicated in the regulation of δ OR signaling (26, 27), one possibility that was assessed was whether Src could distinctively regulate ERK activation by agonists and dual efficacy ligands. Low concentrations of Src inhibitor PP2 (20–40 μ M) blocked ERK activation by TICP but enhanced the response to DPDPE (Fig. 6, A and B) revealing that, indeed, Src had a distinct effect on ERK responses elicited by the two types of drugs. The ability of low concentrations of PP2 (Fig. 6B) or very discrete amounts of inactive Src (Fig. 6C) to increase the magnitude of ERK activation by DPDPE may be interpreted as an indication that Src negatively controls δ OR responsiveness to agonists, an assumption that was confirmed in GTP γ S binding assays, where PP2 was found to protect against agonist-induced desensitization. On the other hand, the fact that ERK activation by TICP was blocked at all levels of Src inhibition (Fig. 6A) not only indicates that this non-receptor tyrosine kinase is an intermediate in ERK stimulation by the dual efficacy ligand but also argues against a regulatory role of Src in the effects of these drugs. The observation that DPDPE-dependent activation of ERK was blocked by high concentrations of PP2 (Fig. 6B) or by the transfection of high quantities of inactive Src indicate that agonists do rely on Src for the stimulation of the MAPK. However, this effect is not apparent at the same level of Src inhibition at which the effect of TICP is blocked, due to the additional regulatory effect of Src on agonist responses.

The interpretation that Src may have contributed to determine the transient kinetics of ERK activation by DPDPE is supported by the fact that PP2 had a stabilizing effect on ERK stimulation by the agonist. Indeed, although PP2 had no significant effect on the decay $t_{1/2}$, it was shown to prolong DPDPE responses by preventing complete fading of ERK activity after the first 10 min of stimulation (Fig. 7C). The mechanism whereby Src inhibition had this stabilizing effect on DPDPE responses is not clear. Although Src has been implicated in the regulation of receptor endocytosis, including δ ORs (27, 38, 39), the fact that the effect of PP2 had no resemblance to that of sucrose indicates that inhibition of sequestration is probably not the main mechanism involved. On the other hand, results from GTP γ S binding assays showing that PP2 enhanced agonist-induced nucleotide binding as well as basal GTP γ S binding activity (Fig. 7A) suggest that Src may also influence δ OR signaling by reducing δ OR-G protein coupling. It is possible then, that the stabilizing effect of PP2 on DPDPE-dependent activity could be linked to a better coupling between agonist stabilized receptors and the corresponding G protein.

In conclusion, this study showed that the agonistic responses of dual efficacy ligands for δ ORs were more sustained and decayed much slower than those of classic agonists. These kinetics were associated with the distinct ability of dual efficacy ligands to stabilize δ ORs in an active conformation that does not trigger the same regulatory mechanisms as classic, highly efficacious agonists.

Acknowledgments—We thank G. Lamothe and K. Huard for their technical assistance.

REFERENCES

- Benovic, J. L., Regan, J. W., Matsui, H., Mayor, F., Jr., Cotechia, S., Leeb-Lundberg, L. M., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 17251–17253.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 3202–3211.
- Zhang, J., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Bodduluri, S. R., Laporte, S. A., Law, P. Y., and Caron, M. G. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7157–7162.
- Lowe, J. D., Cerver, J. P., Gurevich, V. V., and Chavkin, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 15729–15735.
- Cheng, Z. J., Yu, Q. M., Wu, Y. L., Ma, L., and Pei, G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 24328–24333.
- von Zastrow, M., Svingos, A., Haberkstock-Debie, H., and Evans, C. (2003) *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 348–353.
- Tsao, P. L., and von Zastrow, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 11130–11140.
- Roettger, B. F., Ghanekar, D., Rao, R., Toledo, C., Yingling, J., Pinon, D., and Miller, L. J. (1997) *Mol. Pharmacol.* **51**, 357–362.
- Bhowmick, N., Narayan, P., and Puett, D. (1998) *Endocrinology* **139**, 3185–3192.
- Bisello, A., Chorev, M., Rosenblatt, M., Monticelli, L., Mierke, D. F., and Ferrari, S. L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 38524–38530.
- Azzi, M., Charest, P. G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., and Pineyro, G. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 11408–11411.
- Chidiac, P., Hebert, T. E., Valiquette, M., Dennis, M., and Bouvier, M. (1994) *Mol. Pharmacol.* **45**, 490–499.
- Samana, P., Pei, G., Costa, T., Cotechia, S., and Lefkowitz, R. J. (1994) *Mol. Pharmacol.* **45**, 390–394.
- Chidiac, P., Nouet, S., and Bouvier, M. (1996) *Mol. Pharmacol.* **50**, 662–669.
- Gbahou, F., Rouleau, A., Morisset, S., Parmentier, R., Crochet, S., Lin, J. S., Ligneau, X., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganelin, C. R., Schwartz, J. C., and Arrang, J. M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 11086–11091.
- Pineyro, G., Azzi, M., de Léan, A., Schiller, P. W., and Bouvier, M. (2005) *Mol. Pharmacol.* **67**, 336–348.
- Schiller, P. W., Weltrowska, G., Berezowska, I., Nguyen, T. M., Wilkes, B. C., Lemieux, C., and Chung, N. N. (1999) *Biopolymers* **51**, 411–425.
- Valiquette, M., Vu, H. K., Yue, S. Y., Wahlestedt, C., and Walker, P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18789–18796.
- Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Walker, P., and Bouvier, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 13727–13738.
- Pineyro, G., Azzi, M., De Léan, A., Schiller, P., and Bouvier, M. (2001) *Mol. Pharmacol.* **60**, 816–827.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeine, B., and Behr, J. P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7297–7301.
- El Kouhen, O. M., Wang, G., Solberg, J., Erickson, L. J., Law, P. Y., and Loh, H. H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 36659–36664.
- Law, P. Y., Kouhen, O. M., Solberg, J., Wang, W., Erickson, L. J., and Loh, H. H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 32057–32065.
- Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Bhalla, S., Walker, P., and Bouvier, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 4416–4423.
- Kovoor, A., Nappay, V., Kieffer, B. L., and Chavkin, C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 27605–27611.
- Kramer, H. K., Andria, M. L., Kushner, S. A., Esposito, D. H., Hiler, J. M., and Simon, E. J. (2000) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **79**, 55–66.
- Kramer, H. K., Andria, M. L., Esposito, D. H., and Simon, E. J. (2000) *Biochem. Pharmacol.* **60**, 781–792.
- Alves, I. D., Salamon, Z., Varga, E., Yamamura, H. I., Tollin, G., and Hruby, V. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48890–48897.
- Prather, P. L., McGinn, T. M., Erickson, L. J., Evans, C. J., Loh, H. H., and Law, P. Y. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21293–21302.
- Kenakin, T. (1995) *Trends Pharmacol. Sci.* **16**, 232–238.
- Berg, K. A., Maayani, S., Goldfarb, J., Scaramellini, C., Leff, P., and Clarke, W. P. (1998) *Mol. Pharmacol.* **54**, 94–104.
- Zhang, J., Ferguson, S. S., Law, P. Y., Barak, L. S., and Caron, M. G. (1999) *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **19**, 301–313.
- Whistler, J. L., Tsao, P., and von Zastrow, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 24331–24338.
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E., and Whistler, J. L. (2004) *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 953–990.
- Clark, R. B., Knoll, B. J., and Barber, R. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 279–286.
- Kovoor, A., Cerver, J. P., Wu, A., and Chavkin, C. (1998) *Mol. Pharmacol.* **54**, 704–711.
- Keith, D. E., Murray, S. R., Zaki, P. A., Chu, P. C., Lissin, D. V., Kang, L., Evans, C. J., and von Zastrow, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19021–19024.
- Ah, S., Maudsley, S., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J., and Daaka, Y. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 1185–1188.
- Wilde, A., Beattie, E. C., Lem, L., Riethof, D. A., Liu, S. H., Mobley, W. C., Soriano, P., and Brodsky, F. M. (1999) *Cell* **96**, 677–687.

SRC CONTRIBUTES TO DELTA OPIOID RECEPTOR (DOR) DESENSITIZATION BY MODULATING ITS POST-ENDOCYTIC TRAFFICKING

Elodie Archer-Lahlou ^{a,c}, Karine Huard ^c, Nicolas Audet ^{a,c}, Mélanie Paquin-Gobeil ^{a,c}, and Graciela Pineyro ^{a,b,c,*}

^a Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Canada

^b Département de Psychiatrie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Canada

^c Centre de Recherche Fernand-Seguin, Hôpital Louis-H. Lafontaine, Montréal, Canada

Running title: Src inhibitors prevent DOR desensitization by enhancing receptor recycling

* Corresponding author. Département de Psychiatrie, Université de Montréal, 7331 Rue Hochelaga, Montréal, Qc, Canada H1N3V2. Tel: +1 514 251 4015; fax: +1 514 251 2617.

E-mail address: graciela.pineyro.filpo@umontreal.ca

SUMMARY

An important limitation in the clinical use of opiates is their progressive loss of analgesic efficacy over time. We have previously shown that Src activity regulates the duration of DOR-mediated responses, implicating this kinase in regulation of DOR signalling. Therefore, we were now interested in characterizing the mechanism whereby this regulation takes place. Our results show that Src spontaneously interacts with DORs and that agonist binding results in Src activation, destabilization of the pre-formed DOR-Src complex, and receptor phosphorylation. The latter was blocked by Src inhibitor PP2 (20 μ M; 1 h), indicating that Src was responsible for Tyr-phosphorylation of DORs. Src contribution to regulation of DOR signalling efficacy was evaluated by determining how inhibition of this kinase influenced agonist-dependent desensitization. Pre-treatment with PP2 or transfection with a dominant negative mutant form of Src protected DORs from desensitization without interfering with endocytosis. However, the use of a sequestration deficient DOR mutant or incubation with sucrose showed that suboptimal internalization interfered with the protective effect of Src blockers, suggesting a post-endocytic site of action for the kinase. This possibility was confirmed not only by showing that exposure to PP2 increased membrane retrieval of internalized receptors but also by demonstrating that monensin, an agent that interferes with receptor recycling, abolished the ability of PP2 to protect from desensitization.

Furthermore, recovery of DOR ability to interact with endogenous G α i subunits upon agonist removal was enhanced by Src inhibitors. Taken together, these results indicate that Src contributes to DOR desensitization by regulating their post-endocytic trafficking.

INTRODUCTION

Opiates are among the most effective analgesics known but their clinical use is limited by their potential for abuse and frequent side effects such as nausea, vomiting, and constipation. Most if not all of these unwanted actions arise from the activation of the mu opioid receptor (MOR), and cannot be dissociated from MOR-mediated analgesia (1). In contrast, delta opioid receptor (DOR) activation produces antinociception (2,3) with reduced respiratory depression (4), low constipation (5), minimal physical dependence (6), and attenuated addictive potential (7,8). However, a major problem with DORs is that they undergo much faster desensitization than MORs (9,10), which reduces analgesic capacity of its agonists through rapid development of tolerance (11,12).

As for most other members of the G protein coupled receptor (GPCR) superfamily, homologous desensitization of opioid receptors is triggered by GPCR-kinase (GRK) phosphorylation of serine/threonine residues located at the receptor C-terminus and/or third intracellular loop. Subsequent recruitment of β -arrestin prevents further G protein activation by the receptor (uncoupling) and facilitates its interaction with the endocytic machinery (11,12). While the contribution of receptor-G protein uncoupling to

progressive waning of receptor signaling is well accepted, the exact role of receptor endocytosis has been a matter of debate (13). Because internalization basically removes receptors from the cell surface, sequestration was initially considered as a step in signal termination. More recently, MOR sequestration has been directly associated with reduced desensitization and tolerance (14,15)

In fact, the functional consequences of GPCR internalization cannot be fully understood unless considered in the light of post-endocytic trafficking. If sequestration is predominantly associated to lysosomal sorting, as is the case for DORs (16,17), the major consequence of internalization will be proteolytic down-regulation of the receptor and prolonged attenuation of cellular signalling (17-19). In contrast, if sorting to a recycling pathway is the preferred route, internalization is a means of restoring the functional pool of membrane receptors and promoting resensitization of signal transduction (20-22). The sorting of opioid receptors towards recycling/resensitization or degradation is profoundly influenced by the presence of specific amino acid sequences that allow receptor interaction with different "sorting" proteins (13,23). For example, strong binding of the cytoplasmic protein GASP (G protein coupled receptor-Associated Sorting Protein) to helix VIII of DORs is a major determinant that favours receptor degradation over recycling (17,24). On the other hand, a weaker interaction with GASP (17,24) and the presence of the "LENLEAE" C-terminal sequence promotes rapid recycling of MORs over their degradation (22).

Given their prominent influence on receptor signalling, a fundamental question that arises is whether these post-endocytic sorting phenotypes are rigidly determined by amino-acid sequences or if they are subject to dynamic regulation. Since we had previously shown that the duration of DOR signalling was inversely correlated with ligand ability to induce Src-dependent phosphorylation of the receptor (25), our interest was to determine the mechanism whereby this tyrosine kinase contributed to DOR regulation. We found that Src contributes to DOR desensitization by interfering with its membrane recycling. These results not only indicate that post-endocytic sorting of DORs is dynamically regulated by Src, but that modulation of this step plays a determinant role in DOR desensitization.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents- Buffer chemicals, protease inhibitor, DPDPE, forskolin, isobutylmethylxanthine, cycloheximide, Pertussis Toxin (PTX), sucrose, monensin sodium, anti-FLAG M2 affinity resin, and FLAG peptide were purchased from Sigma-Aldrich. 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine (PP2) was from WVR, BSA from EMD chemicals, and [³H]adenosine from PerkinElmer Life Sciences. G418, DMEM, fetal bovine serum, glutamine, penicillin, and streptomycin were purchased from Wisent.

Cell Culture and Transfection- Lipofectamine (Invitrogen) was used to transfect HEK293 cells with mouse DOR cDNA or with a truncated mutant of this receptor (DOR344T), both possessing a FLAG epitope at their amino-terminal end and subcloned into the pcDNA3 expression vector (26,27). Clones stably expressing full-length or truncated DOR receptors were selected using 500 µg/ml G418. For transient transfections, DOR was co-expressed either with a dominant negative mutant form of c-Src (DNM-Src: K295R/Y527F; DNM) (28) or the empty vector pcDNA3 using polyethylenimine. Since the expression vector for DNM-Src increased FLAG-DOR expression, the amount of receptor had to be titrated so as to achieve similar expression levels in all conditions. Thus, 6 and 2 µg of FLAG-DOR were co-transfected respectively with 6 µg of pcDNA3 and 10 µg of DNM-Src. Receptor expression at the membrane was verified by ELISA. Cells were grown and maintained in complete DMEM containing 10% (v/v) fetal bovine serum, 1000 units/mL penicillin, 1 mg/mL streptomycin, and 5 mM glutamine, in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C.

Immunopurification of FLAG-tagged Receptors- This procedure was adapted from a previously described method (25) and was used to assess Tyr-phosphorylation of DORs as well as receptor interaction with endogenous Src or Gα subunits. Briefly, cells were incubated overnight in serum-free medium and the day of the experiment were exposed to PP2 (20 µM) or vehicle (DMSO) for 1 h prior to treatment with DPDPE (1 µM) for the indicated periods of time. After agonist stimulation, the reaction was stopped on ice by washing cells with cold PBS. Cells were then suspended in lysis buffer (5mM Tris, 3 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 5 µg/mL leupeptine, 5 µg/mL soybean trypsin inhibitor, and 10 µg/mL

benzamidine) and homogenized using an ultraturax (IKA, Wilmington, NC). Following a short centrifugation at 1 500 rpm, the supernatant was centrifuged at 18 500 rpm for 20 min and the resultant pellet was resuspended in lysis buffer for a second round of centrifugation (18 500 rpm; 20 min). The pellet obtained was then solubilized in 0.5% *n*-dodecyl-maltoside, 25 mM Tris pH 7.4, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 5 µg/mL leupeptine, 5 µg/mL soybean trypsin inhibitor and 10 µg/mL benzamidine. Following agitation at 4°C for 2 h, the solubilized fraction was centrifuged at 10 000 rpm for 60 min, and the receptor was immunopurified from the supernatant fraction using an anti-FLAG M2 antibody resin. 20 µl of antibody-coupled resin equilibrated in solubilization buffer and supplemented with 0.1% bovine serum albumin (w/v) were used to purify the receptor overnight at 4°C under gentle agitation. The next morning the resin was pelleted, washed twice with 500 µl of solubilization buffer and four times with 500 µl of modified solubilization buffer (containing 0.1% instead of 0.5% *n*-dodecyl-maltoside (w/v)). The receptor was then eluted by incubating the resin for 10 min at 4°C with 100 µl of modified solubilization buffer containing of a FLAG peptide (150 µg /mL). This elution was repeated three times, and the eluates were combined and concentrated by membrane filtration over Microcon-30 concentrators (Millipore). SDS sample buffer was then added and samples were used for SDS-PAGE.

SDS-PAGE and Western Blotting- SDS-PAGE was performed as previously described (25) using a 4% stacking gel and 9% separating gel. Proteins resolved in SDS-PAGE were then transferred (50 mA, 16 h, Bio-Rad Mini-Trans Blot apparatus) from the gels onto nitrocellulose (GE Healthcare). Tyrosine phosphorylation of DORs was assessed using a monoclonal antibody raised against phosphorylated Tyr (PY99; 1:500; Santa Cruz Biotech.). The amount of FLAG-DORs present in each sample was evaluated with antisera directed against the FLAG epitope (anti-FLAG M2 antibody; 1:1000; Sigma-Aldrich). Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibodies (1:4000; Amersham Biosciences) and chemiluminescence detection reagents (GE Healthcare) were used to reveal the blotted proteins and relative intensities of the labelled bands were analyzed by densitometric scanning using MCID (Imaging Research Inc). Receptor phosphorylation was expressed as the ratio between

phosphorylation and FLAG signals to normalize to the amount of receptor protein present in each sample. c-Src polyclonal antibody (SRC2 : sc-18; Santa Cruz Biotech.) and Gxi3 antibody (Sc-262; Santa Cruz Biotech.) were used at a dilution of 1:1000 to determine respectively the amount of total Src and of Gxi3 proteins that had precipitated along with DORs, followed by secondary anti-rabbit horseradish-conjugated antibodies (1:10 000 or 1:40 000; Amersham Biosciences). Total amount of receptor loaded for each sample was detected by probing with anti-Flag M2 antibody (1:2000).

Src activation was assessed as previously described (25), after a 5 min exposure to DPDPE. Samples were separated in SDS-PAGE and anti-phospho-Src polyclonal antibody (Tyr416; 1:1000; Cell Signaling) was used to determine the presence of activated Src. Total amount of protein loaded was detected by probing with anti-Src polyclonal antibody (SRC2 : sc-18; 1:5000; Santa Cruz Biotech.).

cAMP Accumulation Assays- cAMP accumulation assays were carried out according to a previously described protocol (25). Desensitization of DORs (DES) was achieved by a 30 min exposure to DPDPE (1 µM). Cells were then washed three times in cold PBS and the efficacy of washing was confirmed by comparing [³H]naltrindole displacement by the cold ligand in control and DPDPE-treated cells, with no change in naltrindole Ki. To study the effect of a pharmacological inhibition of Src, cells were pretreated for 1 h with PP2 (20 µM) prior to DPDPE exposure. For experiments with a recycling inhibitor, monensin (50 µM) was added together with PP2 (or vehicle for non-treated cells). For sucrose treatment, cells were pre-incubated in the presence of 0.4 M sucrose (2 h) which was maintained throughout successive treatment with PP2 (1 h) and DPDPE (30 min). [³H]ATP and [³H]cAMP were separated by sequential chromatography on Dowex exchange resin and aluminum oxide columns and the results were expressed as the ratio of [³H]cAMP/[³H]ATP plus [³H]cAMP. Effects of the DOR agonist DPDPE were expressed as % of change with respect to cAMP produced in the absence of ligand (values given in tables). When agonist actions were compared across different experimental conditions (eg: following desensitization, sucrose, or monensin treatments) results were normalized to the effect of DPDPE observed in corresponding non-treated control cells (values in figures).

Internalization Assays- Measurement of surface-expressed FLAG-tagged DORs and quantification of receptor internalization was assessed using an ELISA method adapted from (29,30). Cells were seeded at a density of 10^5 cells/well and grown on 24-well polylysine-coated plates for 48 h. The day of the experiment, DPDPE (1 μ M) or vehicle were introduced in new incubation medium containing DMEM/hepes 20 mM for the indicated times. When PP2 (20 μ M) or sucrose (0.4 M) were used, these pre-treatments were respectively introduced 1 h and 3 h prior to the agonist. The internalization reaction was stopped by addition of cold PBS. After three PBS washes, cells were fixed for 15 min at 4°C in paraformaldehyde (3%) and non specific binding was blocked by incubation with PBS/BSA 1%/CaCl₂ 1mM at room temperature for 30 min. Cells were subsequently incubated with anti-FLAG M1 antibody (1:1000; Sigma-Aldrich) for 1 h at room temperature, washed three times and incubated with peroxidase-conjugated (HRP) anti-mouse antibody (1:8000; Amersham Biosciences) for 30 min. After extensive washing, 200 μ L of the HRP substrate *o*-phenylenediamine dihydrochloride (SIGMA FAST™ OPD, Sigma-Aldrich) was added to each well. The reaction was allowed to proceed for 8 min and stopped using 3N HCl. 200 μ L of the mix were then transferred to a 96-well plate for optical density (OD) evaluation at 492 nm in a microplate reader (Victor3; Perkin Elmer). OD reading corresponded to the signal generated by receptors at the cell surface. The amount of surface receptors internalized following exposure to DPDPE (1 μ M) was calculated by subtracting OD obtained in presence of agonist from the one obtained in its absence. Results were expressed as percentage of receptors initially present at the membrane according to the following calculation: $100 \times (\text{OD}^{\text{Basal}} - \text{OD}^{\text{Stimulated}}) / (\text{OD}^{\text{Basal}})$ where OD^{Basal} and OD^{Stimulated} correspond to the signal obtained in presence or absence of DPDPE respectively. When agonist internalization was compared across different experimental conditions (eg: following pre-treatment with PP2 and/or sucrose), results were normalized to DPDPE-induced internalization in corresponding non-treated controls.

Surface recovery assay- Recycling of internalized receptors back to the plasma membrane was estimated by an assay which is a variant of the one described above. Protein synthesis was blocked using 10 μ M cycloheximide introduced 1 h before a single dose of DPDPE (1 μ M; 30 min) and allowed to

remain in the medium throughout the duration of the experiment. The agonist was removed by extensive washing with DMEM and cells were subsequently incubated at 37°C for increasing periods of time in an agonist-free medium (DMEM/hepes/cycloheximide). In experiments using PP2 (20 μ M) and/or monensin (50 μ M), pre-treatments were introduced 1 h prior to DPDPE exposure. The experiments were stopped by addition of cold PBS and the steps to label membrane DORs proceeded as described in the previous section. The amount of internalized receptors that recycled back to the surface was calculated by subtracting OD of stimulated, non-recovered cells from the signal generated by those submitted to recovery in the absence of agonist for increasing periods of time. This difference was then expressed as a percentage of OD signal lost following exposure to DPDPE, representing % of internalized receptors reappearing at the membrane: $[100 \times (\text{OD}^{\text{R}} - \text{OD}^{\text{stimulated}})] / (\text{OD}^{\text{Basal}} - \text{OD}^{\text{stimulated}})$, where OD^{Basal} and OD^{Stimulated} correspond to the signal obtained in presence or absence of DPDPE and OD^R represents the signal obtained after each different time of recovery. When recovery from agonist induced internalization was compared across different experimental conditions (eg: monensin and/or PP2 treatment), results were normalized to recovery that was observed in corresponding untreated control cells.

Data Analysis- Statistical analysis and curve fitting were done using Prism 4 (GraphPad, San Diego, CA).

RESULTS

Src is released following DOR activation and participates in receptor desensitization. In a previous report we showed that Src regulates the duration of agonist signalling at DORs, suggesting that these non-receptor Tyr-kinases could participate in ligand-dependent desensitization of the receptor (25). In order to better characterize how Src regulates DOR signalling, we started by assessing functional and physical interactions between the two proteins. As previously observed, DOR agonist DPDPE (1 μ M; 5 min) induced Src stimulation (25), and sensitivity of this response to PTX established that a functional Gi/o protein was essential for Src activation by DORs (Figure 1A). Physical interaction between the two proteins was examined by measuring the total amount of Src recovered with immunopurified FLAG-tagged receptors. Unlike other GPCRs

(β 2ARs (31); NK1R (32); AT1Rs (33)) which recruit Src upon agonist binding, DOR co-purified with the kinase in the absence of ligand (Figure 1B), suggesting that the proteins coexist within a preformed complex. Addition of DPDPE (1 μ M) to the incubation medium induced rapid destabilization of this interaction, since approximately 50% of the DOR-Src complex disappeared within the first 5 minutes of agonist exposure. This rapid destabilization of the complex was followed by slower dissociation during the remaining 25 minutes of agonist treatment (Figure 1B). Agonist-induced disruption of the complex was not influenced by Src activity since maximal dissociation was not altered following Src inhibition by PP2 (20 μ M; 1 h) (Figure 1B). In contrast, this Src blocker abolished DPDPE-driven Tyr-phosphorylation of DORs (Figure 1C), indicating that Src was able to phosphorylate the receptor (25) despite its rapid dissociation from the complex. Indeed, phospho-Tyr immunoreactivity of DORs was significantly increased even at a time when DPDPE treatment (30 min) had disrupted more than half of the initial DOR-Src complex (Figure 1B).

Src activity and Tyr-phosphorylation of opioid receptors have been previously shown to influence opioid receptor internalization (34,35), but the actual contribution of this kinase to the regulation of opioid receptor signalling remains to be fully characterized. To examine this issue, we determined the effects of a pharmacological inhibitor and a dominant negative mutant of Src on agonist-dependent desensitization of DORs. Receptor signalling was evaluated in cAMP accumulation assays where acute incubation with DPDPE produced a maximal inhibition of $61\% \pm 2$ ($n=22$, pooled control curves) in cAMP production. As expected, 30 minutes pre-treatment with this agonist (1 μ M) diminished its subsequent ability to reduce cAMP production. In particular, DPDPE potency was reduced by 8 fold (EC_{50} CTL = 4 ± 1 vs EC_{50} DES = 32 ± 2 nM) while maximal inhibition was only $72\% \pm 10$ ($n=4$) of that observed in parallel controls (Figure 2A, left panel). However, when desensitization by DPDPE was assessed in presence of a concentration of PP2 that blocked Src activation (Inset figure 2A) and prevented Tyr-phosphorylation of DORs (Figure 1C), the reduction in DOR signalling capacity was no longer observed. This is evidenced by the fact that DORs exposed to DPDPE in the presence of PP2 maintained similar signalling

efficacy as non-desensitized receptors (Figure 2A, right panel).

In order to verify these results, desensitization experiments were repeated in cells co-transfected with DORs and a dominant negative (DNM) Src mutant (K295R/Y527F) (28) (Figure 2B). Transfections were optimized to achieve similar membrane expression of DORs as in the previous experimental series, and DNM-Src levels were titrated to obtain complete inhibition of the endogenous kinase (Inset figure 2B). Results obtained confirmed that in cells over-expressing DNM-Src, the signalling efficacy of desensitized DORs (DPDPE; 1 μ M; 30 min) was not different from that of the corresponding non treated controls (Figure 2B, right panel). In contrast, in cells where DORs were co-transfected with the empty vector (pcDNA3) agonist pre-treatment significantly reduced subsequent ability of DPDPE to inhibit cAMP production (Figure 2B, left panel).

Src blockade protects DOR from desensitization without modifying receptor internalization. Internalization contributes to rapid desensitization of DORs (36) and Src activity has been implicated in the sequestration of various GPCRs (33,37), including DORs (34). Thus, it was deemed of interest to determine if Src contribution to DOR desensitization took place via modulation of internalization. To do so, internalization kinetics were examined in similar conditions of Src inhibition as the ones used in the experiments described in the previous section. In control conditions, DPDPE-dependent internalization of DORs was in reasonable agreement with previous reports (38,39), displaying a half-life of 14 minutes and a maximal sequestration of $87\% \pm 3$ of surface receptors in the first two hours (Figure 3A). Experiments carried out in the presence of PP2 or DNM-Src indicated that neither treatment interfered with DOR endocytosis (Figures 3A and B), despite their prevention of receptor desensitization (Figure 2).

Maximal improvement of DOR signalling following Src blockade requires normal internalization. Having established that Src contributes to DOR desensitization without modifying endocytosis, we then examined whether the converse was true, i.e.: if changes in internalization could influence regulation of DOR signalling by Src. DOR internalization was modified

by two different strategies: a) by using a truncated mutant (DOR344T; (27)) lacking C-terminal Ser/Thr residues involved in internalization of full-length DORs (40,41) and b) by incubating DOR-expressing cells in hypertonic medium (0.4 M sucrose), known to inhibit internalization by interfering with normal clathrin polymerization (42). The way in which each of these strategies modified kinetics of DOR internalization appears in figure 4A. Maximal internalization was reduced by 30% in truncated DORs. The effect of sucrose was more severe, abolishing sequestration for the first ten minutes and inhibiting it by more than 60% for the remainder of agonist exposure.

To determine how changes in internalization influenced regulation of DOR signalling by Src, we recreated same experimental conditions as described above and reassessed the ability of PP2 (20 μ M; 1 h) to hinder DOR desensitization. Results showed that the protective effect of the Src blocker was progressively reduced by treatments that increasingly interfered with internalization (Figure 4B). Table 1 shows that signalling capacity of truncated DORs and their sensitivity to desensitization were similar to that of corresponding wild type controls, as was PP2 ability to re-instate maximal cAMP inhibition in desensitized DOR344T (Figure 4B; left panel). However, DPDPE dose-response curves showed that DOR344T required higher agonist concentrations than wild-type DORs ($p=0.02$; $n=4$) for the protective effect of PP2 to become apparent in cAMP assays. In sucrose-treated cells DOR signalling capacity was less than that of corresponding wild-type controls, as was the extent of desensitization caused by agonist exposure (Table 1). In these circumstances, the protective effect of PP2 was not only right shifted but its magnitude was reduced as compared to wild-type DORs desensitized in the absence of sucrose ($p<0.0001$; $n=4$). Indeed, even if Src blockade still afforded some degree of protection in the presence of sucrose (Figure 4B, right panel), maximal cAMP inhibition was less than that observed when PP2 was used to hamper desensitization of truncated DORs or sucrose-free, wild-type receptors. It should be noted that PP2 did not modify receptor endocytosis in DOR344T-expressing cells nor in sucrose-treated cells expressing wild-type DORs (Inset figure 4B).

Src contributes to DOR desensitization by interfering with receptor recycling to the membrane. Results from the previous section showed that

although Src contribution to desensitization does not directly rely on its modulation of internalization, a reduction in sequestration could negatively influence the efficacy of Src inhibitors to protect from desensitization. This type of behaviour suggested that Src could be modulating a post-endocytic event. Previous studies have demonstrated that a small proportion of internalized DORs are recycled to the membrane, while the bulk of them are rapidly trapped in an endocytic compartment from where they are subsequently targeted for lysosomal degradation (16,43). Since the functional consequence of this sorting pattern is a rapid and long-lasting reduction in receptor signalling capacity (44,45) we reasoned that Src contribution to desensitization could involve controlling sorting of internalized DORs. To assess this possibility, we examined whether PP2 had any effect on membrane recovery of internalized receptors (Figure 5A). Control and PP2-treated cells (20 μ M; 1 h) were incubated with DPDPE (1 μ M; 30 min) in order to induce receptor internalization, following which the agonist was removed and the cells were allowed to recover for the indicated time periods. Exposure to DPDPE induced internalization of $66\% \pm 2$ of the surface receptors both in control and PP2-treated cells. Consistent with previous reports (22,46), $36\% \pm 3$ of the internalized receptors recycled back to the membrane in control conditions. Most interestingly, this recovery was increased by almost 50% in cells exposed to PP2 (Figure 5A).

While these results confirm Src to be a regulator of post-endocytic sorting they do not imply that its participation in desensitization relies upon modulation of recycling. However, if Src were to participate in desensitization by preventing DOR recycling, one would expect that interfering with the latter would inhibit the protective effect exerted by PP2 upon desensitization. Thus, we determined whether PP2-mediated protection would be affected by monensin, a ionophore that blocks receptor recycling by trapping internalized receptors in endosomes (43,47). At a concentration that reduced recycling, monensin (50 μ M; Inset figure 5B;) did not modify the signalling capacity of DORs but it potentiated desensitization (see table 2). Furthermore, co-application of monensin with PP2 abolished all protection from desensitization, indicating that the functional effect of the Src blocker relied upon modulation of recycling (Figure 5B).

Src activity interferes with the recovery of DOR-G protein interaction after desensitization. According to the model of homologous desensitization, progressive loss of agonist responsiveness involves uncoupling of the receptor from the G protein (48) while resensitization requires recovery of a functional, physical link between the two proteins (13,45). Recycling is thought to contribute to this recovery by allowing internalized receptors to return to the membrane, making them available for a new cycle of interaction with their signalling partners (49-51). Thus, if PP2 enhanced membrane recycling of DORs upon agonist removal (Figure 5A) it should also improve recovery of DOR-G protein interaction. In order to examine this issue, FLAG-tagged DORs were immunopurified and the amount of G α recovered with the receptor was determined by western blot analysis. As we had previously reported, the α 3 subtype was sensitive to modulation by sustained ligand exposure (52). Indeed, exposure to DPDPE for increasing periods of time progressively decreased the amount of G α 3 recovered with the receptor, producing about 50% reduction in DOR- α 3 interaction within 30 minutes of agonist treatment (Figure 6A). Although this decrease was not modified by the presence of PP2, the amount of G α 3 co-purifying with the receptor upon agonist removal was significantly higher following Src blockade than in controls (Figure 6B). These results indicate that apart from negatively modulating recycling upon agonist removal, Src activity also slows down the recovery of DOR interaction with its cognate G protein (Figure 6B).

DISCUSSION

The results obtained in this study indicate that the non-receptor tyrosine kinase Src modulates post-endocytic trafficking of DORs. In particular, Src activity inhibits DOR recycling to the plasma membrane contributing to functional desensitization of the receptor and interfering with its recovery upon agonist removal.

Previous reports have shown that internalized DORs are predominantly targeted for lysosomal degradation while only a discrete number recycles back to the plasma membrane (16,22). However, the functional significance of this small proportion of recycled receptors is emphasized by the fact that recycling inhibitors like monensin not only potentiate DOR desensitization (Table 2) but prevent

resensitization upon agonist removal (39). The particular sorting phenotype of DORs has been attributed to its primary sequence, which predetermines non-covalent interactions of the receptor with cytoplasmic sorting proteins (17,24,53). Indeed, DORs possess specific amino acid sequences that are recognized by lysosomal targeting proteins such as GASP (17,53) and SNX-1 (Sorting Nexin-1) (24), and at the same time lack the recycling signal present in other opioid receptors like MORs (22). By showing that DOR trafficking is dynamically regulated by Src, our results indicate that post-endocytic sorting of opioid receptors is not only predetermined by their primary structure.

The remarkable ability of Src inhibitors to eliminate short-term desensitization (Figure 2) confirms a major contribution of this tyrosine kinase in the modulation of DOR signalling efficacy (Audet et al., 2005). Furthermore, the observation that this protective effect is abolished by using monensin to interfere with receptor recycling indicates that Src contribution to desensitization is indeed through modulation of the recycling process. The alternative possibility that Src could be regulating membrane targeting of newly synthesized receptors is unlikely, since the effect of PP2 on membrane recovery of DORs was assessed in cells whose protein synthesis had been blocked by cycloheximide. Moreover, the idea that Src contributes to DOR desensitization through regulation of a post-endocytic event is also supported by the observation that suboptimal internalization interfered with protection afforded by Src blockers. This is clearly evidenced in truncated DORs where a decrease in internalization specifically reduced PP2 efficiency to protect from desensitization. Inhibition of internalization by sucrose also interfered with PP2 protection from desensitization. However, apart from producing a decrease in the magnitude of the protective effect of Src inhibitors incubation with sucrose reduced DOR responsiveness to acute agonist exposure. The latter observation is not surprising given that sucrose has been previously shown to interfere with constitutive internalization of DORs (39), a process that contributes to maintain a steady-state level of active membrane receptors (54,55). In addition, by decreasing agonist-induced internalization by more than 60%, the overall pool of receptors that is available for recycling and consequently targeted by Src is also reduced, consistent with the observed reduction in the absolute magnitude of PP2

protection. It is interesting that following a short period (10 min) of complete inhibition, DOR sequestration in the presence of sucrose progressively recovered to reach almost 40% of membrane receptors. This observation which is in agreement with previous reports showing DOR internalization through a clathrin-independent pathway (41) could provide a substrate for the residual protection by PP2.

Our results demonstrating that monensin inhibited both PP2 protection from desensitization and membrane recycling of DORs are consistent with the notion that Src contributes to DOR desensitization by interfering with receptor recycling and reducing its resensitization in presence of the agonist. In addition, Src also interfered with recovery of DOR signalling potential following agonist removal. This is clearly illustrated by the ability of PP2 to enhance recovery of DOR- α 3 interaction once DPDPE had been removed from the incubation medium. On the other hand, given the ability of PP2 to prevent desensitization by DPDPE, it was quite surprising to observe that Src blockade during agonist exposure had no effect on the amount of G α 3 recovered with DORs. This observation could find a possible explanation in a recent study reporting that the rate of resensitization was 10 fold faster than GPCR dephosphorylation at GRK sites (51). Such results raise the possibility that dissociation of the receptor from β -arrestin rather than dephosphorylation could determine its rapid resensitization. Furthermore, the study also showed that there was no receptor dephosphorylation in presence of an agonist (51), indicating that dephosphorylation would not be a likely mechanism whereby recycling would allow to maintain DOR responsiveness during agonist exposure. Alternatively, recycling could contribute to maintaining agonist-dependent signalling by increasing the number of β -arrestin-free receptors available for interaction with the G protein. However, since being phosphorylated makes the population of recycled receptors highly susceptible to re-binding β -arrestin (56), their interaction with G proteins would be expected to be much more unstable than that of non-phosphorylated counterparts. Hence, one could expect that if Src blockade protects from desensitization via rapid recycling in presence of the agonist, it would do so by increasing the number of membrane DORs available for G protein interaction rather than by restoring DOR affinity for the α

subunit. In such case, the amount of α 3 recovered with immunopurified DORs would still be reduced during agonist exposure despite the ability of Src blockers to interfere with desensitization.

Despite their preferential sorting towards lysosomal degradation, DORs do not undergo immediate proteolysis after internalization (25), and remain retained in the endocytic compartment for at least 60 minutes (16). This behaviour indicates that their poor recycling is not a default consequence of degradation, but the result of a specific sorting event. In this sense, it is worth considering that the interaction site of sorting proteins GASP and SNX-1 on the DOR C-terminus are few amino acids downstream of the NPXY sequence (17,24,53). Given that DOR agonists promote Src-dependent phosphorylation of the receptor (Figure 1C; (25)) and since the tyrosine residue within the NPXY domain has been identified as a major target for tyrosine kinase activity (57), Src could influence DOR trafficking by regulating its interaction with sorting proteins through phosphorylation of DOR Tyr residues. Alternatively, Src activity could be directed towards sorting proteins themselves. This possibility is consistent with results from the present study showing destabilization of the DOR-Src complex upon agonist binding. A plausible substrate for unbound Src could be Hrs (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) (58), which has been recently shown to participate in GPCR recycling and resensitization (59,60). Hence, a major goal for future study will be to determine if and how Src regulates DOR interaction with each of these sorting proteins.

An interesting feature that distinguishes DOR-Src interaction from that of other receptors is that the DOR-Src complex is formed in a ligand-independent manner (Figure 1B) while Src recruitment to β 2ARs, AT1Rs, or NK1Rs is triggered by scaffold formation following agonist binding (31-33,61). In fact, agonist binding to DORs elicits an abrupt decline in the amount of Src recovered with the receptor (\approx 50% decrease in the first 5 min), an observation that is compatible with conformational changes destabilizing the complex. Although the interaction between DORs and Src is quite different from that of other GPCRs, it is highly reminiscent of opioid receptor interaction with calmodulin, whose spontaneous and direct association with DORs is also disrupted upon agonist binding (62). Our results do not allow us to conclude whether Src directly

18. Gullapalli, A., Wolfe, B. L., Griffin, C. T., Magnuson, T., and Trejo, J. (2006) *Mol Biol Cell* **17**, 1228-1238
19. Wang, Y., Zhou, Y., Szabo, K., Haft, C. R., and Trejo, J. (2002) *Mol Biol Cell* **13**, 1965-1976
20. Koch, T., Schulz, S., Pfeiffer, M., Klutzny, M., Schroder, H., Kahl, E., and Holtt, V. (2001) *J Biol Chem* **276**, 31408-31414
21. Koch, T., Schulz, S., Schroder, H., Wolf, R., Raulf, E., and Holtt, V. (1998) *J Biol Chem* **273**, 13652-13657
22. Tanowitz, M., and von Zastrow, M. (2003) *J Biol Chem* **278**, 45978-45986
23. Gray, J. A., and Roth, B. L. (2002) *Science* **297**, 529-531
24. Heydom, A., Sondergaard, B. P., Ersboll, B., Holst, B., Nielsen, F. C., Haft, C. R., Whistler, J., and Schwartz, T. W. (2004) *J Biol Chem* **279**, 54291-54303
25. Audet, N., Paquin-Gobeil, M., Landry-Paquet, O., Schiller, P. W., and Pineyro, G. (2005) *J Biol Chem* **280**, 7808-7816
26. Keith, D. E., Murray, S. R., Zaki, P. A., Chu, P. C., Lissin, D. V., Kang, L., Evans, C. J., and von Zastrow, M. (1996) *J Biol Chem* **271**, 19021-19024
27. Murray, S. R., Evans, C. J., and von Zastrow, M. (1998) *J Biol Chem* **273**, 24987-24991
28. Mukhopadhyay, D., Tsiokas, L., Zhou, X. M., Foster, D., Brugge, J. S., and Sukhatme, V. P. (1995) *Nature* **375**, 577-581
29. Lavoie, C., Mercier, J. F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L. R., Zhu, W. Z., Xiao, R. P., Lakatta, E. G., Bouvier, M., and Hebert, T. E. (2002) *J Biol Chem* **277**, 35402-35410
30. Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004) *Embo J* **23**, 3950-3961
31. Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1999) *Science* **283**, 655-661
32. DeFea, K. A., Vaughn, Z. D., O'Bryan, E. M., Nishijima, D., Dery, O., and Bunnett, N. W. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11086-11091
33. Fessart, D., Simaan, M., and Laporte, S. A. (2005) *Mol Endocrinol* **19**, 491-503
34. Kramer, H. K., Andria, M. L., Esposito, D. H., and Simon, E. J. (2000) *Biochem Pharmacol* **60**, 781-792
35. Pak, Y., O'Dowd, B. F., Wang, J. B., and George, S. R. (1999) *J Biol Chem* **274**, 27610-27616
36. Law, P. Y., Kouhen, O. M., Solberg, J., Wang, W., Erickson, L. J., and Loh, H. H. (2000) *J Biol Chem* **275**, 32057-32065
37. Ahn, S., Maudsley, S., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J., and Daaka, Y. (1999) *J Biol Chem* **274**, 1185-1188
38. Kramer, H. K., and Simon, E. J. (2000) *Neuropharmacology* **39**, 1707-1719
39. Trapaidze, N., Gomes, I., Bansinath, M., and Devi, L. A. (2000) *DNA Cell Biol* **19**, 195-204
40. Kouhen, O. M., Wang, G., Solberg, J., Erickson, L. J., Law, P. Y., and Loh, H. H. (2000) *J Biol Chem* **275**, 36659-36664
41. Trapaidze, N., Keith, D. E., Cvejic, S., Evans, C. J., and Devi, L. A. (1996) *J Biol Chem* **271**, 29279-29285
42. Heuser, J. E., and Anderson, R. G. (1989) *J Cell Biol* **108**, 389-400
43. Wang, W., Loh, H. H., and Law, P. Y. (2003) *J Biol Chem* **278**, 36848-36858
44. Eisinger, D. A., and Schulz, R. (2005) *Crit Rev Neurobiol* **17**, 1-26
45. Marie, N., Aguila, B., and Allouche, S. (2006) *Cell Signal* **18**, 1815-1833
46. Gage, R. M., Kim, K. A., Cao, T. T., and von Zastrow, M. (2001) *J Biol Chem* **276**, 44712-44720
47. Qiu, Y., Law, P. Y., and Loh, H. H. (2003) *J Biol Chem* **278**, 36733-36739
48. Ferguson, S. S. (2001) *Pharmacol Rev* **53**, 1-24
49. El Kouhen, R., Burd, A. L., Erickson-Herbrandson, L. J., Chang, C. Y., Law, P. Y., and Loh, H. H. (2001) *J Biol Chem* **276**, 12774-12780
50. Simaan, M., Bedard-Goulet, S., Fessart, D., Gratton, J. P., and Laporte, S. A. (2005) *Cell Signal* **17**, 1074-1083

51. Tran, T. M., Friedman, J., Baameur, F., Knoll, B. J., Moore, R. H., and Clark, R. B. (2007) *Mol Pharmacol* **71**, 47-60
52. Pineyro, G., Azzi, M., deLean, A., Schiller, P. W., and Bouvier, M. (2005) *Mol Pharmacol* **67**, 336-348
53. Simonin, F., Karcher, P., Boeuf, J. J., Matifas, A., and Kieffer, B. L. (2004) *J Neurochem* **89**, 766-775
54. Chao, C., Ives, K. L., Goluszko, E., Kolokoltsov, A. A., Davey, R. A., Townsend, C. M., Jr., and Hellmich, M. R. (2005) *J Biol Chem* **280**, 33368-33373
55. Paing, M. M., Johnston, C. A., Siderovski, D. P., and Trejo, J. (2006) *Mol Cell Biol* **26**, 3231-3242
56. Bohn, L. M., Dykstra, L. A., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., and Barak, L. S. (2004) *Mol Pharmacol* **66**, 106-112
57. Kramer, H. K., Andria, M. L., Kushner, S. A., Esposito, D. H., Hiller, J. M., and Simon, E. J. (2000) *Brain Res Mol Brain Res* **79**, 55-66
58. Bache, K. G., Raiborg, C., Mehlum, A., Madhus, I. H., and Stenmark, H. (2002) *Eur J Biochem* **269**, 3881-3887
59. Hanyaloglu, A. C., and von Zastrow, M. (2007) *J Biol Chem* **282**, 3095-3104
60. Hanyaloglu, A. C., McCullagh, E., and von Zastrow, M. (2005) *Embo J* **24**, 2265-2283
61. Tao, J., Wang, H. Y., and Malbon, C. C. (2007) *J Biol Chem* **282**, 6597-6608
62. Wang, D., Sadee, W., and Quillan, J. M. (1999) *J Biol Chem* **274**, 22081-22088
63. Cahill, C. M., Holdridge, S. V., and Morinville, A. (2007) *Trends Pharmacol Sci* **28**, 23-31
64. Kieffer, B. L. (1999) *Trends Pharmacol Sci* **20**, 19-26

FOOTNOTES

The FLAG-tagged mouse DOR and the truncated mutant DOR344T subcloned into the pcDNA3 expression vector were kindly provided by Dr. M. von Zastrow. The dominant negative mutant form of c-Src was a gift from Dr. M. Bouvier's laboratory. These studies were supported by research funds from the Canadian Institutes of Health Research and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. E.A.L. was funded by a post-doctoral fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé Québec (FRSQ), M.P.G. was a recipient of FRSQ MSc bursary and G.P. holds an FRSQ award for junior researchers.

The abbreviations used are: DOR, Delta Opioid Receptor; PP2, 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine; DPDPE, *D*-Pen-2,5-enkephalin; MOR, Mu Opioid Receptor; GPCRs, G Protein-Coupled Receptors; GRKs, GPCR-kinases; GASP, G protein coupled receptor Associated Sorting Protein; PTX, pertussis toxin; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DNM, Dominant Negative Mutant; DMSO, dimethyl sulfoxide; ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; OD, optical density; CTL, control; β 2AR, β 2-adrenergic receptor; NK1R, neurokinin-1 receptor; AT1Rs, angiotensin II receptor type 1; ANOVA, analysis of variance; SNX-1, sorting nexin-1.

FIGURES LEGENDS

TABLE 1. *Signalling and desensitization in wild-type DORs, truncated DORs, and wild-type DORs exposed to sucrose.*

cAMP accumulation assays were performed in cells stably expressing wild-type DORs that were exposed to sucrose (0.4M) or not (CTL), as well as in cells stably expressing similar amount of truncated DOR mutants (DOR344T). Results are the mean \pm S.E.M from at least three experiments carried out in triplicate. For each condition Emax values represent the % of change with respect to cAMP production in the absence of ligand.

TABLE 2. *Effect of monensin on DOR signalling and desensitization.*

cAMP accumulation assays were performed in cells stably expressing wild-type DORs, in the presence or absence of monensin (50 μ M). Results are the mean \pm S.E.M from at least three experiments performed in triplicate. For each condition Emax values represent the % of change with respect to cAMP production in the absence of ligand.

FIGURE 1. *DOR stimulation activates Src and reduces its spontaneous interaction with the receptor.*

A. HEK293 cells stably expressing FLAG-tagged DORs were incubated overnight in serum-free medium containing either PTX (100 ng/mL) or vehicle and exposed to DPDPE (1 μ M; 5 min). Src activation was assessed as described under “experimental procedures” by measuring phospho-Tyr416 immunoreactivity. Results correspond to a representative example carried out at least four times. B. Cells were exposed to PP2 (20 μ M; 1 h) or vehicle (DMSO) prior to treatment with DPDPE (1 μ M) for the indicated time periods. DORs were immunopurified as described in the experimental section and DOR-Src interaction was assessed by immunoblot, calculating the ratio between Src and FLAG-immunoreactivity present in each sample. Results represent mean \pm S.E.M. of at least six experiments and are expressed as percentage of the basal ratio. C. Cells were pre-treated with PP2 (20 μ M; 1 h) or vehicle prior to treatment with DPDPE (1 μ M; 30 min), following which the receptor was immunopurified and Tyr-phosphorylation assessed by immunoreactivity. Results shown correspond to a representative example of five similar experiments.

FIGURE 2. *Src contributes to functional desensitization of DORs.*

A. HEK293 cells stably expressing DORs were incubated overnight with [3 H]adenosine. The day of the experiment cells were exposed for 1 h to PP2 (20 μ M) or vehicle (DMSO) and then submitted (DES) or not (CTL) to a desensitizing treatment by adding DPDPE (1 μ M) for additional 30 min. Following treatment cells were thoroughly washed and used in cAMP accumulation assays (see experimental procedures) to generate dose response curves for DPDPE. Results are expressed as % of maximal cAMP inhibition obtained in non-desensitized controls and correspond to at least 3 experiments carried out in triplicate. Statistical comparison between desensitized and non desensitized conditions was assessed using two-way ANOVA. *Left panel*: $p < 0.0001$; $n = 4$; *Right panel*: $p = 0.7$; $n = 3$. Non-desensitized curves carried out in presence of PP2 were not significantly different from corresponding controls. *Inset*: representative example of the effect of PP2 pre-treatment (20 μ M; 1 h) on Src activation by DPDPE, measured by Phospho-Src immunoreactivity. B. HEK293 cells were transiently transfected with DOR/pcDNA3 or DOR/DNM-Src and cAMP assays were performed 48h after transfection. Desensitization, expression of results and statistical analysis as in A. *Left panel*: $p = 0.0002$; $n = 5$. *Right panel*: $p = 0.7$; $n = 5$. Non-desensitized curves carried out in DOR/pcDNA3 and DOR/DNM-Src were not significantly different from one another. *Inset*: representative example of the effect of DNM-Src overexpression on Src activation by DPDPE, measured by Phospho-Src immunoreactivity.

FIGURE 3. *Conditions of Src blockade that protect from desensitization do not modify DOR internalization.*

Internalization of surface receptors was measured following incubation with DPDPE (1 μ M) for the indicated periods of time. Presence of DORs at cell surface was measured by ELISA as explained in “experimental procedures”. Results are expressed as % of maximal internalization observed in corresponding controls and represent mean \pm S.E.M. of seven independent experiments carried out in triplicate. A. DOR internalization was assessed in cells stably expressing wild-type DORs, following exposure to PP2 (20 μ M; 1h) or vehicle (DMSO). Curves carried out in presence of PP2 were not significantly different from control curves (CTL). B. DOR internalization was assessed in transiently transfected cells expressing DOR/pcDNA3 or DOR/DNM-Src. Curves obtained with DOR/pcDNA3 were not significantly different from those obtained with DOR/DNM-Src.

FIGURE 4.

Maximal improvement of DOR signalling following Src blockade requires normal internalization.

A. Internalization of surface receptors by DPDPE (1 μ M) was measured in cells stably expressing wild-type DORs that were exposed or not to sucrose (0.4 M) as well as in cells stably expressing similar amount of

truncated DOR mutants (DOR344T). Internalization assays were performed as in figure 3 and results were expressed as % of maximal internalization observed for wild-type DORs not treated with sucrose (CTL). Values correspond to mean \pm S.E.M. from at least four independent experiments carried out in triplicate. Statistical differences between curves were established by two-way ANOVA. CTL vs DOR344T: $p < 0.0001$; $n = 5$; CTL vs Sucrose: $p < 0.0001$; $n = 4$. B. The effect of PP2 pre-treatment (20 μ M; 1 h) on DPDPE-dependent desensitization (1 μ M; 30 min) was assessed in truncated DORs (DOR344T) (*left panel*) and in wild-type DORs that were exposed to sucrose (0.4 M) for the length of the experiment (*right panel*). cAMP accumulation assays were performed as in figure 2. Results are expressed as % of maximal cAMP inhibition obtained in corresponding naïve, wild-type controls, and represent values of at least four experiments carried out in triplicate. Statistical comparison between dose response curves for DPDPE in cells desensitized in the presence of PP2 or vehicle was done by two-way ANOVA. *Left panel*: DOR344T DES vs DOR344T DES + PP2: $p = 0.01$; $n = 4$; *Right panel*: Sucrose DES vs sucrose DES + PP2 $p = 0.03$; $n = 6$. Thin lines superimposed on each graph correspond to dose response curves obtained in wild-type DORs not exposed to sucrose following desensitization in the absence (dashed line) or presence (full line) of PP2. *Inset*: representative example of the effect of PP2 on internalization of DOR344T and on wild-type DORs that were exposed to sucrose. Results were expressed as % of maximal internalization observed in wild-type, untreated DORs.

FIGURE 5.

Src contributes to DOR desensitization by interfering with receptor recycling to the membrane. A. HEK293 cells stably expressing wild-type DORs were incubated with PP2 (20 μ M; 1 h) or vehicle (DMSO) prior to DPDPE exposure (1 μ M; 30 min) in order to induce internalization. The agonist was then removed and cells allowed to recover for the indicated time periods before membrane receptors were assessed using an ELISA-based method described in the experimental section. The assays were conducted in the presence of cycloheximide to block protein synthesis. Results are expressed as % of maximal recovery of internalized receptor obtained in control cells. The data represent mean \pm S.E.M. from seven independent experiments carried out in triplicate. Statistical comparison between curves (CTL vs PP2) was assessed using two-way ANOVA ($p < 0.0001$; $n = 7$). B. The effect of PP2 on desensitization of wild-type DORs was assessed as in previous figures with the experiment being conducted in the presence of monensin (50 μ M). Results are expressed as % of maximal cAMP inhibition obtained in non-desensitized, non monensin-treated controls and correspond to three experiments carried out in triplicate. Statistical comparison of DPDPE dose response curves obtained from cells desensitized in presence or absence of PP2 was carried out using two-way ANOVA. DES + monensin vs PP2 DES + monensin: $p = 0.2$; $n = 3$. *Inset*: representative example of DOR membrane recovery in presence or absence of monensin. Experiments were carried out as in A. and results are expressed as % of maximal recovery of internalized receptor in cells that were not exposed to monensin.

FIGURE 6.

Src activity interferes with recovery of DOR-G protein interaction upon agonist removal. A. HEK293 cells expressing FLAG-tagged DORs were exposed to DPDPE (1 μ M) for the indicated periods of time prior to DOR immunoprecipitation. The purification product was then separated by electrophoresis SDS-PAGE and subject to successive western blot analyses using anti- α i3 and anti-FLAG antibody. DOR- α i3 interaction was assessed by calculating the ratio between α i3 and FLAG-immunoreactivity present in each sample. Results were expressed as percentage of α i3/FLAG ratio obtained in basal conditions and represent mean \pm S.E.M. of at least four experiments. B. Recovery of DOR- α i3 interaction after desensitization (DES) by DPDPE (1 μ M; 30 min) was assessed by monitoring the amount of G α i3 co-purified with DORs following removal of the desensitizing agonist at the indicated times (recovery 30 min and 1 h). Results represent mean \pm S.E.M. of at least four experiments and are expressed as percentage of α i3/FLAG ratio obtained in non-desensitized cells. Statistical comparison of recovery values in presence or absence of PP2 was performed using a two-way ANOVA and p values appear in the figure. Differences between α i3/FLAG ratio in desensitized vs recovery

conditions within each group were established by one-way ANOVA followed by Neumann-Keuls post-hoc test (* $p < 0.05$).

TABLE 1

	CTL		DES		Two-way ANOVA CTL vs DES
	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (% of inhibition)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (% of inhibition)	
CTL (n=7)	5.5 ± 1.4	64.0 ± 2.8	31.8 ± 1.5	42.5 ± 2.4	p<0.0001
DOR344T (n=9)	5.9 ± 1.4	60.5 ± 2.7	19.7 ± 2.7	43.0 ± 6.1	p=0.0045
Sucrose (n=3)	74.5 ± 3.1	42.2 ± 7.1 *	53.4 ± 1.8	33.2 ± 3.2	p=0.0280

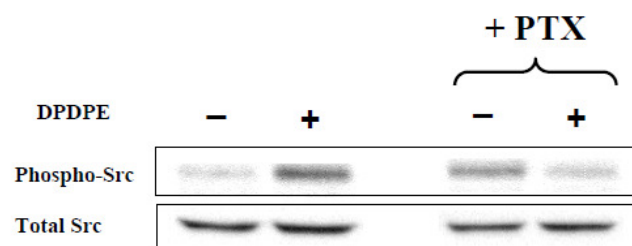
* two-way ANOVA CTL vs sucrose : p=0.0007, n=3

TABLE 2

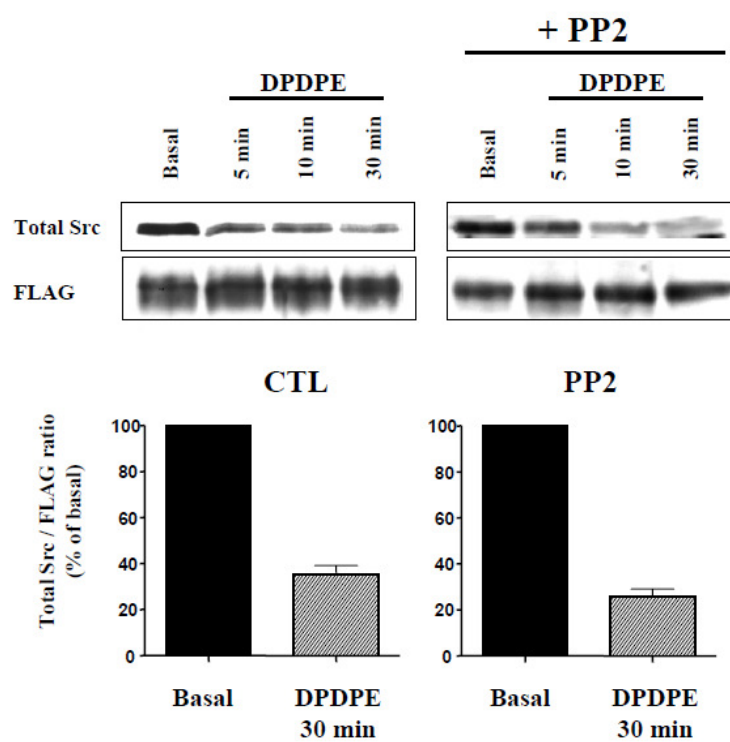
	CTL		DES		Two-way ANOVA CTL vs DES
	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (% of inhibition)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (% of inhibition)	
CTL (n=5)	1.7 ± 1.2	70.6 ± 1.7	12.9 ± 1.2	64.7 ± 1.5	p<0.0001
Monensin (n=3)	5.4 ± 1.6	75.8 ± 4.5	12.5 ± 1.3	51.5 ± 1.8 *	p<0.0001

* two-way ANOVA CTL DES vs monensin DES : p<0.0001

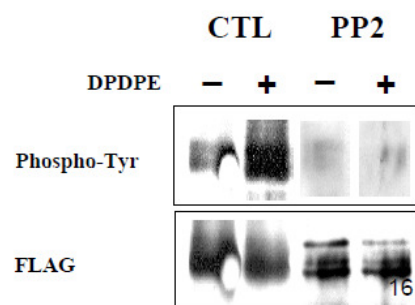
1A



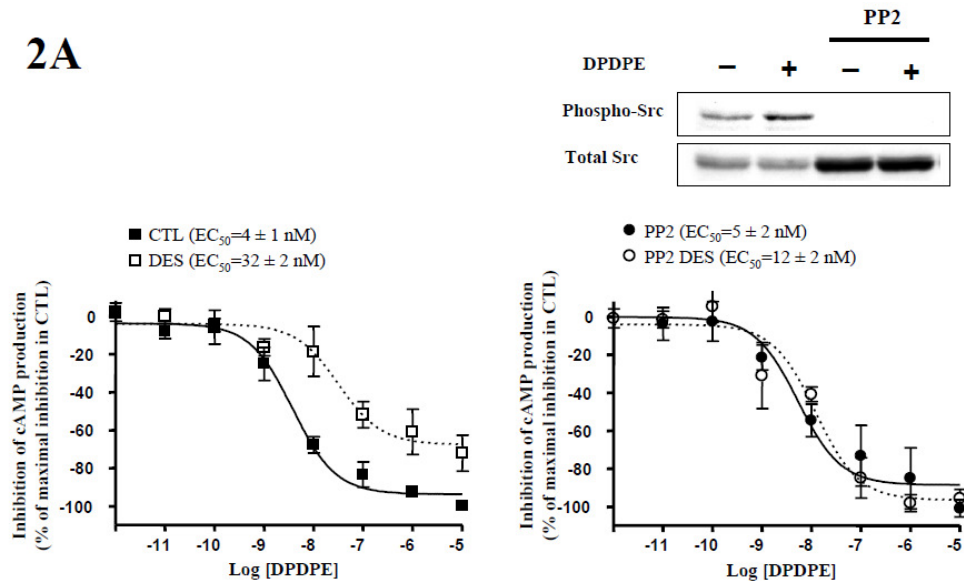
1B



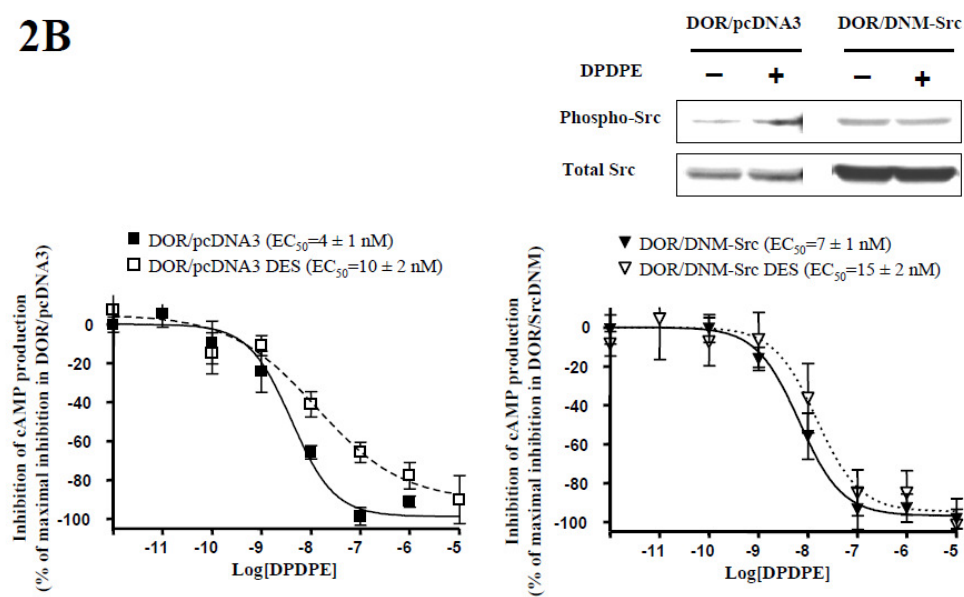
1C

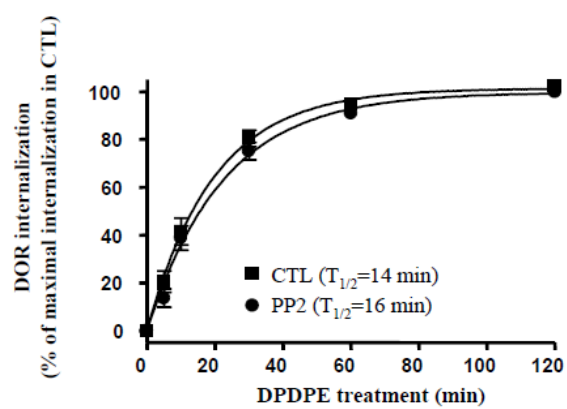
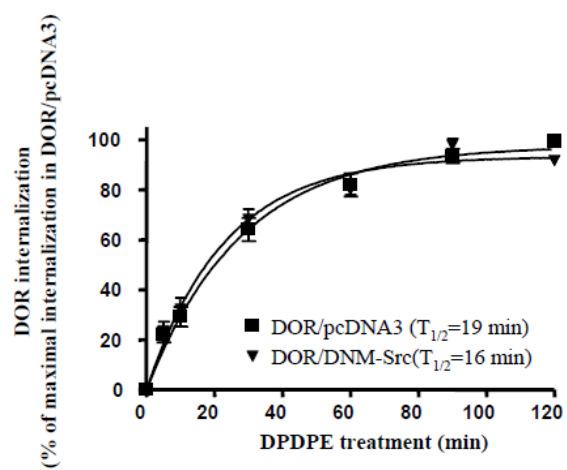


2A

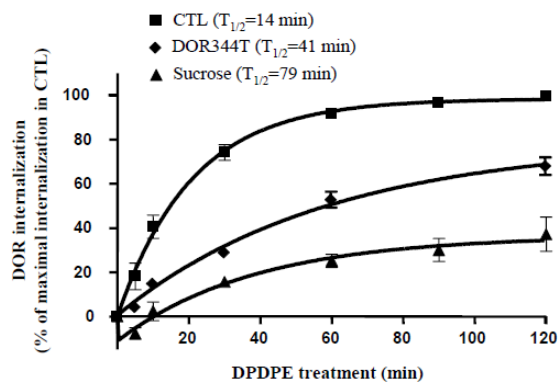


2B

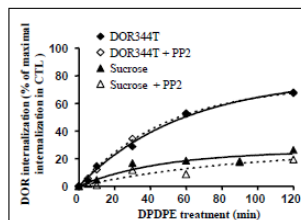
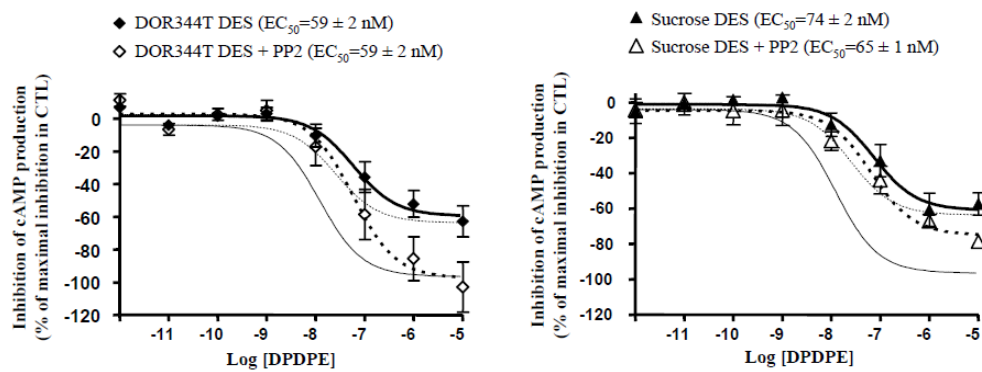


3A**3B**

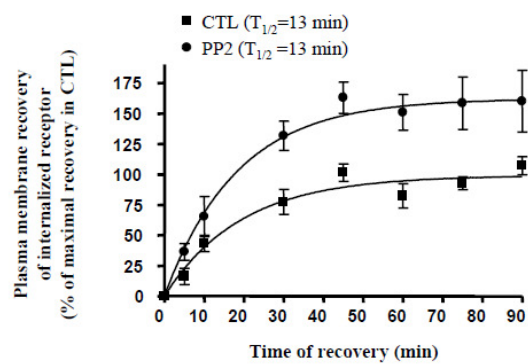
4A



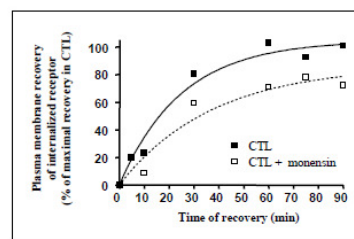
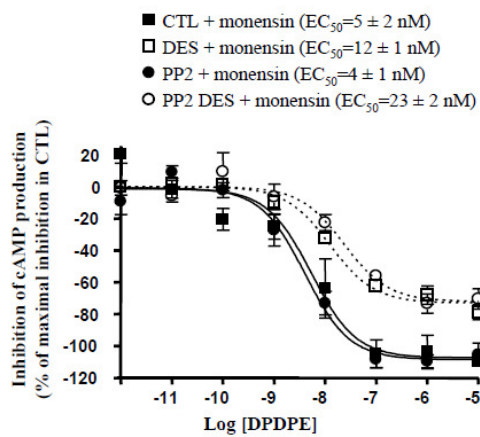
4B



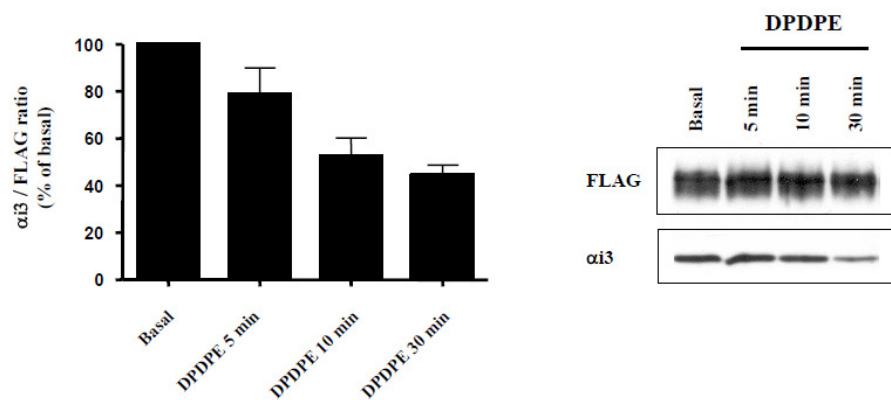
5A



5B



6A



6B

